

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA APLICADA**

**Evaluación de un método de ensayo microbiológico
para determinar la potencia antibiótica de tirosina**

TESIS

para optar al título profesional de Químico Farmacéutico

AUTORAS

Danitza Maud Cárdenas Sifuentes

Diana Giovanna Asencios Juárez

ASESORA

Mirtha Roque Alcarraz

Lima-Perú

2008

*A Dios,;
porque sin él nada sería posible
Y en su infinita sabiduría nos da lecciones difíciles de aprender
comprendiéndolas en el camino de nuestras vidas.*

*A mi papá Aurelio y mi mamá Haydee,
con amor y cariño, por estar siempre a mi lado
y por todo el apoyo brindado*

*A mi querida abuelita Ernestina
que me dió los recuerdos bellos de mi infancia*

Danitza

*A la Mg. Mirtha Roque Alcarraz
por su orientación e invaluable asesoría y
apoyo en la realización de la tesis*

*Nuestro agradecimiento por sus consejos
y recomendaciones a los
distinguidos miembros del jurado:*

*Presidente:
Mg. Víctor Crispín Pérez*

*Miembros:
Q.F. María Elena Salazar Salvatierra
Mg. Gustavo Bravo Orellana
Q.F. Rosario Carreño Quispe*

*Nuestro especial agradecimiento
por su amistad, orientación y apoyo:*

Q.F. Carlos Gutiérrez Vázquez

INDICE

I. RESUMEN.....	2
II. INTRODUCCIÓN	4
III. GENERALIDADES	6
3.1. Uso de antibióticos en salud animal	
3.2. Definiciones	
3.3. Tilosina	
3.4 Valoración biológica de antibióticos	
IV. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	22
4.1. Tipo de Valoración	
4.2. Materiales, Reactivos y equipos	
4.3. Estandarización del método	
4.4. Procedimiento	
V. RESULTADOS.....	30
5.1. Determinación de la Potencia Antibiótica de la tilosina tartrato por método de excavación Muestra Problema N° 1	
5.2. Determinación de la Potencia Antibiótica de la tilosina tartrato por método de excavación Muestra Problema N° 2	
5.3. Determinación de la Potencia Antibiótica de la tilosina tartrato por método de excavación Muestra Problema N° 3	
5.4. Comparación de resultados y metodología	
VI. DISCUSION.....	58
VII. CONCLUSIONES.....	62
VIII. RECOMENDACIONES.....	63
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	64

I. RESUMEN

En el presente trabajo se determinó experimentalmente la potencia antibiótica de la Tilosina tartrato, mediante una metodología alternativa de valoración microbiológica a la descrita en la USP 30.

El método "Turbidimétrico" referido en la USP 30 para la valoración de la potencia antibiótica de Tilosina en las condiciones del laboratorio no fue el más óptimo, debido a que mostró dificultad en su ejecución y variabilidad en las mediciones de las lecturas de las respuestas frente a un sistema biológico. Por tanto, se evaluó otras metodologías y parámetros del ensayo hasta encontrar un método y condiciones que ofrezcan a los laboratorios veterinarios una opción alternativa, sensible, específica y reproducible para la valoración de potencia antibiótica de Tilosina.

La metodología empleada fue el método microbiológico de difusión por excavación, basado en los lineamientos dados en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 30) y la Farmacopea Británica (BP 2008). Se utilizaron tres lotes de Tilosina tartrato (lotes diferentes; como principios activos), un estándar USP y el microorganismo *Kocuria rhizophila* ATCC 9341.

Este método microbiológico condujo a resultados satisfactorios y concordantes, con las especificaciones del contenido de Tilosina tartrato de los lotes evaluados; según la USP 30.

Se determinó las condiciones de ensayo apropiadas para este método de valoración, siendo las principales: la utilización del microorganismo *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 y del medio antibiótico N° 11; la proporción de inoculación en el medio de 1,5 mL por cada 100 mL de agar; la dosis media del estándar de 10,0µg ; tiempo de difusión del antibiótico en el agar inoculado de 8 horas; tiempo de incubación de 24 horas y temperatura de incubación entre 32 - 35°C.

Estos parámetros críticos fueron adecuadamente monitorizados para garantizar la reproducibilidad del método.

Finalmente, con los resultados obtenidos se pudo concluir que el método microbiológico de difusión por excavación en agar para la determinación de la potencia antibiótica de Tilosina tartrato es confiable para demostrar la efectividad antibiótica; de acuerdo a los requerimientos de la calidad establecidos por la USP 30.

SUMMARY

In this work was determined experimentally the potency of the antibiotic Tylosin tartrate, through an alternative methodology for assessing microbiological to the one described in the USP 30.

The method "Turbidimetric" mentioned in the USP 30 for the valuation of the antibiotic potency of Tylosin in laboratory conditions was not the most optimal, because it showed difficulty in its execution and variability in the measurements of the reading responses to a biological system. Therefore, we evaluated other methodologies and parameters of the test until finding a method and conditions to offer an alternative option, sensitive, specific and reproducible to Veterinary Laboratories, for the antibiotic potency valuation of Tylosin.

The methodology used for this determination was the microbiological method of diffusion by excavation, based on the guidelines given in the United States Pharmacopoeia (USP 30) and the British Pharmacopoeia (BP 2008). We used three batches of Tylosin tartrate (different lots; active ingredients), a USP standard and the *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 microorganism.

This microbiological method led to satisfactory results and consistent with the content specifications of lots assessed from Tylosin tartrate, according to USP 30.

It was determined the suitable test conditions for this valuation methodology, being the main ones: the use of the microorganism *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 and antibiotic medium N° 11, the proportion of inoculation in the medium of 1.5 ml per 100 ml of agar, the standard medium dosage of 10.0 ug, diffusion time of the antibiotic in the agar inoculated for 8 hours, incubation time of 24 hours and incubation temperature between 32 - 35 °C.

These critical parameters were properly monitored to ensure the reproducibility of the method.

Finally, the results can conclude that the microbiological method of diffusion by excavation into agar to determine the antibiotics potency of Tylosin tartrate is reliable to demonstrate the effectiveness antibiotic, according to the requirements of quality set by the USP 30.

II. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las organizaciones requieren cada vez más establecer sistemas eficientes de calidad para ser competitivas pudiendo así satisfacer las necesidades de los clientes y de la propia organización. Esta afirmación es también válida para la industria farmacéutica, en la que existe un conjunto de regulaciones que son de obligatorio cumplimiento para la comercialización de los productos.⁷

En la industria farmacéutica, los conceptos de garantía de calidad, buenas prácticas de manufactura (BPM) y control de calidad constituyen aspectos muy importantes de la administración de la calidad, la cual se define como el aspecto de la función administrativa que determina y pone en práctica la “política de calidad”, es decir la orientación y las intenciones generales de un organismo en lo que respecta a la calidad, en la forma como lo expresan y lo autorizan las autoridades superiores de dicho organismo.

El control de la calidad es la parte de las BPM que se refiere al muestreo, especificaciones, y ensayo, como también a los procedimientos de organización, documentación y autorización que aseguren que los ensayos necesarios y pertinentes realmente se efectúen, y que no se permita la circulación de los materiales, ni se autorice la venta o suministro de los productos, hasta que su calidad haya sido aprobada como satisfactoria. El control de la calidad no se limita a las operaciones de laboratorio, sino que debe estar presente en todas las decisiones concernientes a la calidad del producto.

Los productos veterinarios deben satisfacer las exigencias de calidad que se precisan en la reglamentación vigente. Las pruebas de control de calidad, se aplicarán y exigirán de acuerdo a la naturaleza del producto, para lo cual deberá tenerse presente las referencias señaladas en el registro.^{10, 22, 23} Un producto farmacéutico de uso veterinario deberá demostrar condiciones químicas, físico-químicas y biológicas de sus componentes, en cantidad y calidad de acuerdo con la formulación y dentro de los márgenes aceptados, según el tipo y características del producto.¹⁰

Las especificaciones requeridas, como parte de la información técnica, para comprobar la eficacia de la Tilosina incluye la prueba de potencia antibiótica. La cual puede ser demostrada bajo condiciones adecuadas, mediante la comparación

cuantitativa del efecto inhibidor de una muestra y la de una sustancia de referencia en presencia de un microorganismo testigo, obteniendo así un valor de potencia relativo al del estándar de referencia. Para este fin, se debe emplear una metodología que conduzcan a un alto grado de seguridad en la obtención de resultados, precisos y exactos.

La valoración de la potencia antibiótica de la Tilosina referida en la USP 30 es el método “Turbidimétrico”, el cual no fue el más adecuado en su ejecución y obtención de respuestas..

Las pruebas de potencia valorada que cumplan con los requisitos necesarios respecto a los límites de confianza también pueden basarse en otros métodos biométricos reconocidos que tengan una precisión equivalente a los métodos descritos en la USP.²⁶ Es así, que las propuestas para adoptar nuevas metodologías analíticas alternativas o complementar las ya existentes, deben ser respaldadas por información que las validen y sustenten.

Para dar pie al diseño y evaluación de una propuesta de valoración de potencia antibiótica de la Tilosina, se utilizó el método alternativo de “Difusión” por excavación en placa, el cual es sustentado en referencias bibliográficas y los datos obtenidos.

Siendo la propuesta en la presente tesis un aporte para el desarrollo posterior de una metodología para el análisis de potencia antibiótica de la tilosina tartrato.

Objetivo general:

- Diseñar y evaluar una metodología alternativa de análisis microbiológico para determinar experimentalmente la potencia antimicrobiana de la Tilosina.

Objetivos específicos:

- Obtener resultados cuantificables de la potencia antibiótica de la Tilosina tartrato, empleando como método de difusión por excavación en placa
- Determinar las condiciones más óptimas de los elementos a emplear en el método propuesto para la generación de resultados adecuados.
- Comparar los resultados generados con este método con un patrón USP, para ver la proximidad y confiabilidad del método.
- Examinar estadísticamente los resultados de la metodología empleada para una futura validación o estandarización del método propuesto.

III. GENERALIDADES

3.1. USO DE ANTIBIÓTICOS EN SALUD ANIMAL

Las sustancias antimicrobianas se emplean en veterinaria con fines terapéuticos y profilácticos para tratar o bien prevenir infecciones.

Los antibióticos también son empleados en producción animal como promotores del crecimiento. Para este fin no se requiere el uso de la receta veterinaria, ya que son considerados aditivos del pienso, y existe una lista positiva de antibióticos autorizados en función de la especie animal.¹

La propiedad de los antibióticos de mejorar las tasas de crecimiento animal se conoce desde finales de los años cuarenta. Posteriormente se confirmó esta propiedad en múltiples antibióticos y para diversas especies animales. Todo esto conduce a una mejora en la productividad y reduce la mortalidad de los animales.

En los últimos años, la comunidad científica ha manifestado una gran preocupación por el alarmante incremento de la resistencia a antibióticos debido al problema que esto supone en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Numerosas publicaciones científicas, han destacado la posible relación entre el uso de antibióticos en animales y el incremento de resistencias a dichos compuestos en bacterias de importancia en patología humana y animal. Mucho se ha hablado del uso de los antibióticos como promotores del crecimiento de animales destinados al consumo humano, del escaso control en su utilización y del riesgo sanitario de dicho uso.

El empleo de antibióticos con fines profilácticos y terapéuticos en medicina, veterinaria y agricultura contribuyen también a la selección de bacterias resistentes. Por ello se hace necesario llevar a cabo políticas de uso racional y prudente de los antibióticos en todos los ámbitos que permitan controlar el problema de las resistencias.¹

El mercado de productos veterinarios es muy importante y con gran potencial de crecimiento, no sólo en el ámbito interno sino también en el internacional.¹⁸

En el mercado veterinario los productos apuntan tanto a ganado de carne como de leche, por lo que tienen fuerte presencia dentro del sector lechero. Se destacan la línea de antibióticos.¹⁸

Es importante también destacar el incremento del consumo de productos veterinarios de línea reproductiva y hormonal.

Actualmente los productos veterinarios han cobrado gran relevancia; contando con un vademécum de treinta productos y más de diez lanzamientos proyectados para 2008.¹⁸

En Latinoamérica, los laboratorios que elaboran productos farmacéuticos y biológicos para los animales de producción conforman un sector que hoy tiene un gran potencial de crecimiento.

El mercado veterinario en general y el de animales mayores en particular, ha registrado un crecimiento sostenido. Específicamente en el área de productos elaborados por laboratorios y destinados a los “animales mayores”, es posible estimar que en los últimos cinco años hubo un crecimiento entre el 20 y 25 por ciento anual. Sin embargo todavía el potencial de mayor desarrollo sigue siendo alto.^{12,13}

En materia de elaboración de laboratorios veterinarios, “animales mayores” es el nombre con el que se agrupa a todos los productos que se fabrican destinados a los animales de producción de alimentos, exceptuando a aves y cerdos que constituyen, en general, una categoría particular.^{12,13}

3.1.1. REGULACIÓN DE SENASA Y REGISTRO DE PRODUCTOS VETERINARIOS

El Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), es la autoridad nacional y el organismo oficial del Perú en materia de sanidad agraria.

El SENASA, mantiene un sistema de Vigilancia Fitosanitaria y Zoonosanitaria, que protege al país del ingreso de plagas y enfermedades que no se encuentran en el Perú. Además de un sistema de cuarentena de plagas de vegetales y animales, en lugares donde existe operaciones de importación.

El SENASA, brinda los servicios de inspección, verificación y certificación fitosanitaria y zoonosanitaria, diagnostica, identifica y provee controladores biológicos. Además registra y fiscaliza los medicamentos veterinarios, alimentos para animales, a los importadores, fabricantes, puntos de venta y profesionales encargados y emite licencias de internamiento de productos agropecuarios.^{21,22}

La comercialización de productos veterinarios regulada por SENASA tiene como finalidad garantizar la calidad sanitaria de los productos veterinarios, prevenir las reacciones adversas o residuos de los mismos en los animales y en el hombre y evitar la contaminación ambiental.

El registro de productos veterinarios aplica para las empresas fabricantes, importadoras y distribuidores de productos veterinarios y tiene como sustento legal al D.S. N° 015-98-AG, R.J. N° 031-98-AG, Decisión 483 de la CAN, D.S. N° 016-2002-AG.^{10, 11, 22,23}

3.2. DEFINICIONES

- a) **Potencia Verdadera:** La real potencia de el material/ preparación durante el tiempo del ensayo. En la práctica este valor puede ser nunca exactamente evaluado.
- b) **Potencia establecida o Potencia declarada:** Ésta es frecuentemente un valor nominal asignado a una preparación de formulación conocida de la potencia de la materia prima o a granel. En caso de material a granel o materia prima, este podría ser calculado de la data de ensayo.
- c) **Potencia Estimada:** La potencia declarada de la data de ensayo. Es un error referir como una “mejor estimación”.
- d) **Limite Fiducial:** [Intervalo de confianza] Hay límites para la potencia verdadera de las materias/ preparaciones y son calculadas en suposición que no hay tendencia o parcialidad en el sistema de ensayo. Ellos pueden ser calculados en algún nivel deseado de probabilidad. Un nivel de 0.95 es aplicado. El concepto es que, si el ensayo puede ser repetido varias veces, la verdadera potencia estaría dentro de los límites fiduciales en 95% de valoración.

En algunas pruebas particulares, la verdadera potencia puede ser en cualquier lugar dentro de los límites fiduciales (y ocasionalmente fuera de éste). Y la potencia estimada no es mejor medida que la potencia verdadera.
- e) **Liberación y revisión de los ensayos:** Un ensayo de liberación es una prueba llevada a cabo por aquellos responsables en asignar una potencia a un material o declaración de un contenido o concentración para la preparación (manufacturación). Una prueba controlada o revisada es un ensayo que se lleva a cabo por aquellos responsables por verificar la potencia de un material, contenido o concentración de una preparación (autoridad de control, analistas independientes y adquisidores de material a granel).⁶

El uso de estas dos condiciones no implica una fundamental diferencia en el diseño y ejecución de un ensayo; pero bastante en la interpretación de los resultados obtenidos. Un ensayo de revisión sólo permite a un analista de control decir inequívocamente cuando un material/ preparación es insatisfactorio. ⁶

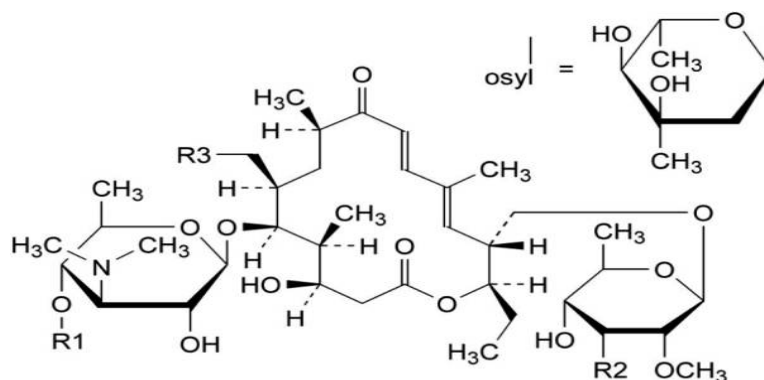
3.3. TILOSINA

La Tilosina es un antibiótico del grupo de los macrólidos; utilizado para combatir neumonía, septicemia hemorrágica, mastitis, conjuntivitis, leptospirosis, micoplasmosis, etc. en diversos animales domésticos como ovinos, caprinos, bovinos, cerdos y aves. ¹⁴

La Tilosina fue descubierta en 1960 por Mc Guire y colegas. Es una mezcla de antibióticos macrólidos producidos por una variedad de *Streptomyces fradiae* u otro semejante. ⁹

3.3.1. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

3.3.1.1. Estructura química



Name	Mol. Formula	R1	R2	R3
tylosin A	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	osyl	OCH ₃	CHO
tylosin B	C ₃₉ H ₆₅ NO ₁₄	H	OCH ₃	CHO
tylosin C	C ₄₅ H ₇₅ NO ₁₇	osyl	OH	CHO
tylosin D	C ₄₆ H ₇₉ NO ₁₇	osyl	OCH ₃	CH ₂ OH

3.3.1.2. Componentes:

La tilosina es un antibiótico macrólido constituido por diferentes sustancias de las cuales la Tilosina A es el componente mayoritario (80%) y el de mayor actividad que los otros componentes ⁹

La Tilosina B (desmicosina, M_r 772), tilosina C (macrocina, M_r 902) y tilosina D (relomicina, M_r 918), la lactenocina, la 5-oximicaminosiltilonolida y la desmicinosiltilosina.^{6,9} Pueden también estar presentes. Ellos contribuyen a la potencia de la sustancia a ser examinada.⁶

3.3.1.3. Fórmula Molecular: La fórmula molecular es $C_{46}H_{77}O_{17}$ ²⁵

3.3.1.4. Peso Molecular: 916.14g/mol.²⁵

3.3.1.5. Potencia: No menor de 900 IU/mg, calculada con referencia a la sustancia seca.

3.3.1.6. Aspecto: Polvo blanquecino a ligeramente amarillento.

3.3.1.7. Solubilidad: Poco soluble en agua (5 mg/mL a 25°C) la solubilidad esta en relación inversa a la temperatura. Bastante soluble en alcohol, ésteres, cetonas, Clorato de hidrocarburo, benceno y éter. Insoluble en Clorhidrato de Hidrocarburo. Insoluble en Hidrocarburos no clorhidratados.^{9,25} Se disuelve en soluciones diluidas de ácidos minerales^{6,9}

3.3.1.8. Absorbancia máxima: 232 nm⁹

3.3.1.9. Sales de Tilosina: La tilosina puede formar sales solubles en agua con tartrato, fosfato, lactato, bisulfato, gluconato, y el hidroclorehidrato. También puede formar ésteres.

Las soluciones acuosas son estables a pH 5,5- 7,5 a temperatura de 25°C durante un periodo de 3 meses; ya que posteriormente disminuye el pH a 4,5 y otros compuestos como la Desmicosina, las cuales actúan y pasan a formar productos inertes.⁹

3.3.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ACCIÓN TERAPÉUTICA

La tilosina está indicado para uso veterinario y tiene una gran actividad sobre bacterias aerobias grampositivas como *Bacillus sp.*, *Corynebacterium spp.*, *E. rhusiopathiae*, *Listeria spp.* Algunos estafilococos y estreptococos. También muestra actividad sobre bacterias aerobias gramnegativas como *Actinobacillus spp.*, *Campylobacter spp.*, *Leptospira spp.*, *Neisseria spp.*, y algunas bacterias anaerobias como *Bacteroides spp.* (Excepto *B. fragilis*) *Clostridium spp.*, cocos anaerobios y *Mycoplasma spp.*^{9,14}

Moderadamente susceptible son algunos enterococos, algunos *Actinomyces spp.*, y algunos *Fusobacterium spp.*, *Haemophilus spp.*, *Legionellas spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Miycobacterium spp.*, también es activo sobre *Vibrio coli* y *Chlamidia*.

Son resistentes a la tilosina, las enterobacterias: *Pasteurella*, *Pseudomonas spp.*, *Nocardia spp.*, *Bortedella bronchiseptica* y *Brucella spp.*

Este antibiótico es utilizado por su gran espectro sobre los microorganismos causantes de la gran mayoría de las mastitis y la alta concentración en el caso de Pietín, Endometritis, Neumonías, Abscesos por Estafilococos, Conjuntivitis, Leptospirosis y otras infecciones por microorganismos sensibles a la tilosina.

En caso de Leptospirosis, Disenterías, Erisipelas, Bronconeumonía enzoótica porcina, por artritis a mycoplasmas, clostridiosleptosiras y otros.¹⁴

3.3.3. MECANISMO DE ACCIÓN

La tilosina inhibe la íntesis proteica; por lo que se le define como un compuesto bacteriostático. La síntesis proteica se logra gracias a la traducción de la información genética codificada al ARNm. La síntesis se da a lugar en los ribosomas en tres etapas: iniciación, elongación (que comprenden de tres fases: reconocimiento, transferencia y translocación) y terminación.

El ribosoma 70S, compuesto por las sub-unidades 30S y 50S, es la unidad funcional de la síntesis proteica en las bacterias. La inhibición de la síntesis es producida mediante la unión reversible del fármaco a las proteínas ribosómicas L22 y L27 de la sub-unidad 50S.

La unión ocurre sólo cuando la sub-unidad 50S está libre de ARNt.³

La unión a la proteína L27 del fármaco inhibe la formación de los anillos peptídicos previo al proceso de translocación. Los macrólidos en general no se unen a los ribosomas de los mamíferos, sino a los de los organismos procariotas. Efectivamente, pueden unirse a los ribosomas mitocondriales de los mamíferos; pero no trasvasar la membrana de la mitocondria, lo cual evita la depleción de la médula ósea.⁹

3.3.4. RESISTENCIA BACTERIANA

Por ser la tilosina un macrólido con más de 16 carbonos no inducen a la aparición de resistencia bacteriana adquirida.³

Existe resistencia cruzada entre todos los macrólidos, y entre éstos y las lincosamidas. Por lo tanto, estos antibióticos no deben asociarse entre sí, ni tampoco reemplazarse uno por otro cuando la respuesta clínica a uno de ellos no sea satisfactoria.³

3.4. VALORACIÓN BIOLÓGICA DE ANTIBIÓTICOS

3.4.1. FUNDAMENTO

La potencia de un antibiótico es estimada por la comparación de la inhibición del crecimiento sensible de un microorganismo producido en concentraciones conocidas de un antibiótico a ser examinado y una sustancia de referencia.⁶

Los ensayos deben ser diseñados de manera tal que permitan examinar la validación del modelo matemático en el cual la ecuación de la potencia se basó; a menos que de otra manera se establezca en la monografía, los límites fiduciales de error ($P = 0.95$) de los ensayos para potencia antibiótica serán no menos de 95% y no más de 105% de la potencia estimada.⁶

3.4.2. MÉTODOS DE ENSAYO

Se utilizan dos métodos generales: método turbidimétrico y método de difusión. En ambos métodos se debe preparar la solución de la referencia o patrón y del antibiótico a ser examinado teniendo concentraciones conocidas y presumidas para tener una igual actividad. Debido a la evaluación de la validación del ensayo usar no menos de tres dosis de la sustancia de referencia y tres dosis del antibiótico a ser examinado teniendo la misma actividad presumida con la dosis de la referencia. Es preferible una serie de dosis en progresión geométrica. En los ensayos de rutina cuando la linealidad del sistema ha sido demostrada sobre un número adecuado de experimentos usando un ensayo de tres puntos, un ensayo de dos puntos puede ser suficiente, sujeto de aprobación por la autoridad competente; sin embargo en toda clase de disputa, un ensayo de tres puntos tal como se describió líneas arriba debe ser aplicado.⁶

3.4.2.1. Método Turbidimétrico

Se basa en la inhibición del crecimiento de un cultivo de microbiano en una solución uniforme del antibiótico en un medio líquido que promueva su rápido crecimiento en ausencia del antibiótico.²⁶

El método consiste en inocular en un medio adecuado una suspensión del microorganismo escogido, que tenga una sensibilidad al antibiótico a ser examinado; tal que se dé una inhibición lo suficientemente grande en las condiciones del ensayo. Usar una cantidad conocida de la suspensión escogida; así como obtener una medida de opacidad leíble después de un periodo de incubación cerca de 4 horas.

Usar el medio inoculado después de su preparación.

Distribuir en igual volumen de cada una de las soluciones en tubos de ensayo idénticos y adicionar a cada tubo un igual volumen de medio inoculado (por ejemplo 1L de solución y 9mL de medio inoculado).

Preparar al mismo tiempo dos tubos de control sin antibiótico, ambos conteniendo el medio inoculado y uno de los cuales es agregado inmediatamente 0,5mL de formaldehído. Estos tubos son utilizados como blancos en el aparato de medición óptico.

Por todos los lados del tubo, distribuir al azar el antibiótico. Llevar rápidamente los tubos a baño maría a una temperatura de incubación adecuada y mantenerlos durante 4 a 3 horas. Después de la incubación detener el crecimiento adicionando 0,5mL de formaldehído a cada tubo o incrementar el calor en los tubos.⁶ Leer su transmitancia o absorbancia para tres tubos significativos en un espectrofotómetro adecuado con un filtro de 530nm o 580nm.²⁶

Limitaciones: Si bien el método es rápido presenta algunas limitaciones:

- a) La sustancia a examinar y estándar deben solubilizarse.
- b) La sustancia a examinar no debe dar color.
- c) El medio de cultivo no debe de aumentar de coloración a causa de la sustancia que se está examinando.
- d) La sustancia a examinar preferentemente debe ser estéril y no debe contener nutrientes; debido a que promoverían un mayor crecimiento de los microorganismos en comparación del cultivo con la sustancia de referencia.
- e) No aplica para microorganismos que formen aglomerados.
- f) La ejecución del proceso es engorroso y puede dar turbidez variable.

- g) Requiere de especial precaución en la distribución uniforme de la temperatura de incubación para que no exista variabilidad de crecimiento de los microorganismos en los diferentes tubos.
- h) Asegurarse de un idéntico tiempo de incubación.
- i) El corte de la incubación debe ser simultáneo en todos los tubos.
- j) La medición de la respuesta debe ser objetiva.^{15, 6}

3.4.2.2. Método de Difusión

Este método está basado en la difusión del antibiótico ya sea desde un *cilindro vertical, disco o excavación* a través de una capa de agar gelificado en una placa Petri, en una extensión; tal que se produce la inhibición del crecimiento de los microorganismos agregados en un área circular o “zona de inhibición” que contiene una solución de antibiótico.^{19, 26}

El método puede resumirse de la siguiente manera; licuar un medio adecuado para las condiciones del ensayo e inocularlo a una temperatura adecuada por ejemplo de 48°C a 50 °C para formas vegetativas, con una cantidad conocida de suspensión de microorganismos sensibles al antibiótico a ser examinado, tal que las zonas de inhibición producidas se observen formas definidas y claras, con un diámetro adecuado con las concentraciones del antibiótico.

Inmediatamente verter en placas Petri una cantidad del medio inoculado para formar una capa uniforme de 2mm a 5mm de espesor. El medio consiste de dos capas, y sólo la capa superior sería la inoculada.

Almacenar las placas tal que no se aprecie el crecimiento o muerte de los microorganismos y que no ocurriese antes de que las placas sean utilizadas y por tanto la superficie del medio este seca al momento de ser usado.

Se puede aplicar las soluciones en la superficie del medio utilizando:

- a) **Cilindros estériles de porcelana o de acero inoxidable**, o se puede considerar cualquier otro material adecuado.
- b) **Excavaciones preparadas en el agar**. El mismo volumen de la solución debe ser adicionada a cada cilindro o excavación.
- c) **Discos estériles absorbentes de calidad adecuada**, también puede ser usado alternativamente, el disco debe impregnarse con la solución de la sustancia de referencia o de la solución del antibiótico a ser examinado y colocarlo sobre la superficie del agar.

Disponer de las soluciones en cada placa Petri en concordancia a un diseño estadístico adecuado, excepto para placas Petri pequeñas que no pueden ser acomodadas más de seis soluciones. Acomodar las soluciones del antibiótico a ser examinados y la solución de la referencia en una manera alterna para evitar interacción de las soluciones de mayor concentración.

Incubar a una temperatura adecuada por 24 horas aproximadamente.

Medir los diámetros con una precisión de por lo menos 0.1 mm o las áreas de las zonas de inhibición circular con una a precisión correspondiente y calcular la potencia utilizando métodos estadísticos apropiados.

Usar en cada ensayo el número de replicaciones por dosis suficientes para asegurar la precisión apropiada. El ensayo podría ser repetido y los resultados combinados estadísticamente para obtener la precisión adecuada y averiguar si la potencia del antibiótico a ser examinado es menor que la mínima requerida.⁶

Limitaciones: Se deben considerar los siguientes factores que afectan la valoración por este método.

- a) El antibiótico debe difundirse a través del agar.
- b) Se debe considerar que el espesor de la capa del medio de cultivo debe ser homogéneo.
- c) El pH del medio de cultivo y del diluyente deben ser adecuados; ya que el pH muy ácido hace que algunos antibióticos aminoglucósidos y macrólidos pierdan potencia, mientras que un pH muy alcalino disminuye la actividad de las penicilinas.
- d) El método de difusión no es aplicable para microorganismos de desarrollo lento. Si se requiere de una incubación prolongada para lograr suficiente desarrollo y obtener una zona de inhibición detectable, el antibiótico puede llegar a deteriorarse al punto de producir lecturas imprecisas.
- e) Para los antibióticos que difunden lentamente en el agar, se deben producir cambios bastantes grandes en los valores de las concentraciones del antibiótico, antes de que se puedan observar variaciones significativas medibles en las zonas de inhibición. El elevado contenido de la dosis (por ejemplo 300 µg/mL) contrarresta en cierta medida la difusibilidad lenta; sin embargo los resultados pueden ser no fidedignos para antibióticos de migración lenta, se deben usar controles.

- f) Los métodos de difusión no son aplicables en microorganismos anaerobios. El largo periodo de incubación necesario para la recuperación de muchos anaerobios hace difícil establecer esquemas interpretativos confiables.¹⁵

3.4.2.2.1. Periodo de Difusión

Un periodo de difusión *a priori* a la incubación es usualmente de 1 a 4 horas, en un cuarto con una temperatura aproximada de 4°C. Tal adecuación, se usa para minimizar los efectos de la variación en el tiempo de aplicación de la solución y mejorar la curva.⁶

Tan pronto como se coloca el antibiótico, éste se pone en contacto con la masa del agar, difundiéndose en el medio que lo rodea. Si la placa ha sido previamente inoculada con una suspensión bacteriana, se produce un crecimiento simultáneo de bacterias. Cuando se alcanza una masa de bacterias crítica, la actividad inhibitoria del antibiótico es superada y se produce el crecimiento bacteriano.

El tiempo (tiempo crítico) para alcanzar la masa celular crítica (de 4 a 10 horas en las bacterias estudiadas habitualmente) es característico para cada especie, pero es influenciado por la composición del medio y la temperatura de incubación. La amplitud lateral de la difusión del antibiótico antes que sea alcanzado en tiempo crítico será afectada por la profundidad del agar, debido a que la difusión ocurre en tres dimensiones.

En el punto en el cual se alcanza la masa celular crítica aparece un círculo marginado bien delimitado de crecimiento bacteriano, si la prueba ha sido realizada correctamente.¹⁵

3.4.3. DISEÑO DE VALORACIÓN

Las valoraciones microbiológicas ganan su precisión con la segregación de fuentes relativamente grandes de posibles errores y desviaciones a través de diseños experimentales adecuados. En una valoración por el método de difusión en placa, las comparaciones esenciales están restringidas a las relaciones entre las mediciones del diámetro de la zona dentro de las placas, excluyendo la variación entre placas en su preparación y posterior

manipulación. En el diseño de valoración, lo recomendado es una valoración con una curva estándar.

Si una valoración se computa con una potencia inferior al 80% o superior al 125% de la asumida en la preparación de la solución Madre de la Muestra, se debe considerar como preliminar. En dicho caso, ajustar la potencia asumida y repetir la valoración.

Las determinaciones microbiológicas de potencia están sujetas a variables de intervaloración e infravaloración, de modo tal que se requieren de dos o más valoraciones independientes para obtener una estimación confiable de la potencia de una determinada preparación de valoración o Muestra desconocida. Comenzando con soluciones madre preparadas por separado y diluciones de prueba del estándar y de la muestra desconocida.

El resultado combinado de una serie de valoraciones independientes más pequeñas a lo largo de varios días es una estimación confiable.²⁶

3.4.3.1. Factores a controlar en el Diseño

Un factor a controlar en el diseño y en los análisis de las valoraciones es la variabilidad del sistema de pruebas biológicas, cuya respuesta media puede variar entre un laboratorio y otro. Para controlar esta variación se compara con un estándar de referencia USP.

La variación en la respuesta se reduce tanto como es posible mediante la utilización del estándar de referencia, cepas de microorganismos conocidos, equipos calibrados y medios certificados a un ambiente controlado enfrentando aleatoriamente el estándar y la muestra, monitorizando otros factores.²⁶

Optimización del bioensayo del césped bacteriano en la placa

Cada antibiótico tiene un sistema de las diluciones que se recomiendan para producir la curva estándar. La concentración más baja de la dilución estándar debe producir una zona clara de la inhibición en un césped bacteriano del organismo apropiado, con la concentración apropiada del UFC. Si es necesario se ajusta el nivel blanco del césped bacteriano para optimizar los resultados de la prueba. Se puede determinar la cantidad de la suspensión del inóculo necesario para incorporar a las placas, usando la fórmula siguiente:

$$X = (TV)/C$$

Donde:

X = Cantidad de suspensión stock del inóculo para ser adicionado al agar fundido (mL)

T = Número de microorganismos blancos (deseados) como césped (UFC/mL)

V = Volumen del agar fundido (mL)

C = Concentración de suspensión stock del inóculo (UFC/mL)

La concentración de la suspensión del inóculo utilizada debe ser escogida de tal manera que se obtenga una óptima relación lineal entre el logaritmo de la dosis y la respuesta en las condiciones del ensayo. (La relación "T" y el apropiado crecimiento en las placas, parte de la determinación de "C". El ensayo de las proporciones de suspensión madre de microorganismos que se debe agregar a la solución salina estéril para formar la concentración del inóculo debe dar como resultado una demarcación satisfactoria de zonas de inhibición produciendo una relación de dosis reproducible).⁴

3.4.3.2. Diseños para Minimizar la Varianza de Error

En algunas valoraciones, las respuestas potenciales pueden reunirse en conjuntos homogéneos antes del tratamiento. Las diferencias entre los conjuntos se pueden separar posteriormente, de manera que no afecten adversamente ni a la potencia calculada ni a su intervalo de confianza. Cada tratamiento se adjudica a una unidad seleccionada aleatoriamente, dentro de cada conjunto. Un ejemplo de *conjunto aleatorio* son los halos de inhibición en una placa individual en la valoración de un antibiótico. En estos casos el orden de los tratamientos puede influir de manera parcial en la potencia o en la precisión.

3.4.3.3. Rechazo de Observaciones

Se rechaza una respuesta dudosa debido a que no cumple con el procedimiento durante el curso de una valoración. En algunos casos sólo después de tabular las respuestas pueden descubrirse otros valores aberrantes. Pero entonces pueden relacionarse con irregularidades en la valoración que justifiquen su omisión. El rechazo arbitrario ó la conservación arbitraria de un resultado aparentemente aberrante pueden ser una importante fuente de

parcialidad. Por lo general, el rechazo de observaciones que se basa únicamente en su magnitud relativa es un procedimiento que debe usarse con poca frecuencia. Cuando esto sea inevitable, cada respuesta que se sospecha aberrante o anómala deberá analizarse conforme a uno de los criterios indicados en el Anexo N° 7.²⁷

3.4.3.4. Reemplazo de valores Faltantes

El cálculo de la potencia y su intervalo de confianza a partir de la respuesta total para cada dosis de cada preparación requiere el mismo número de observaciones en cada total. Cuando se pierden observaciones o se han obtenido respuestas adicionales con el Estándar, el equilibrio se puede reestablecer mediante uno de los siguientes procedimientos a fin de que se puedan emplear las ecuaciones usuales.

- a) Reducir el número de observaciones en los grupos más grandes hasta que el número de respuestas sea el mismo para cada tratamiento
- b) Alternativamente, un grupo más pequeño ocasional puede llevarse el tamaño adecuado cuando el número de respuestas faltantes no sea más de una en cualquier tratamiento, o no represente más del 10% de totalidad de la valoración.²⁷

3.4.4. CÁLCULOS DE LA POTENCIA

La potencia se determina indirectamente por la comparación entre las respuestas a dosis conocidas del estándar y la respuesta de una o varias dosis similares de la muestra. Generalmente, se puede graficar una medida adecuada de la respuesta como una línea recta frente al logaritmo de la dosis, lo que simplifica el cálculo de la potencia y su intervalo de confianza, todo esto dentro de un intervalo de dosificación adecuado. Tanto la pendiente como la posición de la relación respuesta en función del logaritmo de la dosis se determinan en cada valoración, usando dos o más niveles del estándar o preferentemente del estándar y de la muestra.

Cuando se requiere una prueba preliminar o la valoración depende de la interpolación a partir de una curva de dosis múltiples del estándar, se grafica en papel milimetrado la respuesta media del estándar a cada nivel de dosis en el eje de las ordenadas frente al logaritmo de la dosis X en el eje de las abscisas.

Si la representación muestra una tendencia básicamente lineal a lo largo del intervalo de dosis requerido, la unidad de respuesta inicial se puede usar directamente como Y ; si por el contrario la tendencia es visiblemente curvilínea una transformación adecuada de cada lectura podrá conferir linealidad.

3.4.4.1. Interpolaridad a partir de una curva estándar

Si la curva de respuesta del logaritmo de la dosis del estándar en una valoración dada es curvilínea y se ajusta gráficamente a los puntos trazados, la cantidad del estándar que se esperaría que produzca cada respuesta Y observada de una Incógnita (muestra), se calcula por interpolación desde la curva y luego se ajusta teniendo en cuenta la concentración conocida de su solución de prueba.

3.4.4.2. Error experimental

Este término se refiere a la variación residual en la respuesta de los indicadores biológicos y no a un error en el procedimiento o a valores aberrantes que necesiten ser reemplazados.

Se mide en términos de varianza del error de una respuesta individual u otra unidad, la cual se designa uniformemente como s^2 . Se requiere en las pruebas de validez de la valoración y para el cálculo de intervalo de confianza.

La Varianza de Error de una respuesta Individual; aparentemente la diferencias en las dosis que modifican la respuesta media no afectan la variabilidad de la respuesta.²⁷

Por lo que el cálculo de la varianza de error depende del diseño de la valoración y de la manera en que se realicen los ajustes para cualquier valor faltante.

3.4.5. PRUEBA DE VALIDEZ DE LA VALORACIÓN

Además de los requisitos específicos de la prueba, y de la curva combinada de logaritmo de dosis- respuesta con una pendiente significativa, se necesita dos condiciones que determinan la validez de una valoración factorial individual:

- (1) La curva de Logaritmo de dosis - respuesta para la Incógnita debe ser paralela a la del estándar dentro del error experimental.
- (2) Ninguna de las curvas debe apartarse significativamente de una línea recta.

Una valoración puede no pasar la prueba de validez; sin embargo puede proporcionar un estimado de la potencia que se puede combinar apropiadamente con el resultado de una segunda valoración de la misma muestra problema.

La dosis extrema ya sea del estándar o de la muestra, o ambos, puede dar respuestas que se hallen fuera de la parte lineal de la curva. Si emplean tres o más niveles de dosis y se obtienen valores relativamente grandes, la respuesta total de la dosis de una preparación puede aproximarse al límite superior o inferior y ser responsable de los valores elevados. Este valor puede omitirse y la potencia recalcularse nuevamente con un diseño apropiado.

Si entonces la valoración se hace lineal, la potencia resultante se alterna con la de una segunda valoración para calcular el Log- potencia de la muestra.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. TIPO DE VALORACIÓN

Difusión en agar por el método de excavación.

4.2. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Materiales:

- Fiolas de 20ml, 25mL 50mL y 100 mL. *Kimax® Clase A*
- Micropipeta (10- 100µL). *Eppendorf ® serie 2000*
- Pipetas de 0.5mL, 1.0 mL, 5mL, y 10mL. *Brand® Germany - Clase A*
- Placa Petri de vidrio (20 x 100mm). *Pyrex® USA*
- Pinzas de acero inoxidable
- Sacabocados de acero inoxidable de 4 mm de diámetro
- Vernier (0-150 mm) Digital. *Caliper – Model DC- 515*

Reactivos y Medios

- Medios antibiótico N° 1 ; *Merck®*
- Agua destilada
- Solución de NaOH 0.1N
- Solucion salina NaCl 0.9%
- Buffer fosfato N°3 (pH 8.0)
- Buffer fosfato N°16 (pH 7.0)

Equipos

- Espectrofotómetro. *Milton Roy –Spectronic 601*
- Contador de Colonias Fisher Scientific
- Estufa de incubación

4.3. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

Se llevó a cabo en un ambiente limpio, asegurando que la limpieza de los equipos se realice antes y después de la prueba. El material de vidrio utilizado en la prueba estuvo esterilizado ya sea por método de calor seco o por vapor.

La temperatura fue controlada durante la siembra del microorganismo y preparación del inóculo; así como en la incubación de las placas.

4.3.1. PREPARACIÓN DE RECEPTÁCULOS

Las placas Petri empleadas fueron aproximadamente de 20 x 100 mm con cubiertas del mismo material y de encaje adecuado al receptáculo.

4.3.2. PREPARACIÓN DE MEDIOS Y SOLUCIONES DE TRABAJO

4.3.2.1. Medios

Los medios requeridos para la siembra y crecimiento de un microorganismo en particular están descritos en el Anexo N° 1. Para la preparación de los medios se siguieron las instrucciones dadas en el Anexo N°2;

Es posible que puedan existir modificaciones ligeras de los ingredientes individuales o medios reconstituyentes, siempre que no alteren las propiedades del microorganismo o mejoren la promoción del crecimiento microbiano y den una curva similar de repuesta estándar.^{26, 27}

4.3.2.2. Buffer Fosfato

La preparación de soluciones reguladoras de pH se hizo de acuerdo como esta indicado en el Anexo N° 3. Se prepararon las soluciones amortiguadoras fosfato N° 3 (0,1M pH=8) y N° 16 (0,1M pH=7), las cuales fueron esterilizadas posteriormente a su preparación y ajuste, por calor por vapor. Se midió el pH después de la esterilización.

4.3.2.3. Solución de BaSO₄ (equivalente 2.0 en la escala Mac Farland)

Se agregó 2mL de una solución de BaCl₂ 0.048 M (BaCl₂.2H₂O 1,175 % p/v) a 98 mL de una solución de H₂SO₄ 0,36 N. Se llevó a una longitud de onda de 530nm, usando como blanco la solución salina estéril, el cual dio de absorbancia 0.7028.

4.3.2.4. Preparación de diluyente final

Se llevó 100mL de Metanol a una probeta y adicionar buffer fosfato N° 3 (vol 1:1) hasta completar a 200 mL.

4.3.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO N° 11 EN LAS PLACAS PETRI

Se preparó 700 mL de medio antibiótico N° 1, diluir y llevó a pH final 8,3 con ayuda de ácido clorhídrico 0,1N e hidróxido de sodio 0,1N para convertirlo a agar antibiótico N° 11.²⁶

Luego, se separó en dos contenedores el volumen de 400 mL y 300 mL de agar respectivamente, se llevaron a esterilización en autoclave (121 °C x 15 minutos).

Se corroboró el pH final del agar 8,3 +/- 0,1. Después de la esterilización, se enfrió y conservó el agar fundido a una temperatura entre 45 °C – 50 °C.

4.3.4. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR (ST)

4.3.4.1. Obtención de la Solución madre o Stock

El estándar debe ser conservado en un refrigerador para su preparación. y ser utilizado dentro del periodo indicado.

Para preparar la dilución Stock se pesó aproximadamente 1g de Tilosina tartrato estándar primario. Se llevó a una fiola de 100mL, disolviendo gradualmente con Metanol, hasta completar el volumen. Se obtuvo una primera concentración 10 mg/mL.

Posteriormente se llevó 1mL de ésta concentración a una fiola de 10mL y se diluyó con Buffer N° 16 (pH= 7). Se obtuvo así la solución madre 1 mg/mL. (Ver Anexo N° 4).

$$\text{Sol. stock} = 1\,000\mu\text{g//mL} = \frac{\text{Peso ST mg}}{100\text{mL}} \times \frac{1\text{mL}}{10\text{mL}} \times (\text{Potencia ST } \mu\text{g/mg})$$

4.3.4.2. Obtención de las Concentraciones de la Prueba:.

Se utiliza el diluyente final hasta llegar a la concentración asignada por el presente trabajo para la dosis media.

En el día de la realización del ensayo, a partir de la solución stock, se prepararon, 5 o más diluyentes de prueba.⁶

Con el diluyente final previamente preparado, se realizó las siguientes diluciones a partir de la solución madre, para llegar a las concentraciones estimadas.

TABLA N° 1
DILUCIONES DE PRUEBA DE ESTÁNDARES DE REFERENCIA

Tomar de la Sol. stock	Diluir con el Diluyente final en	Tomar de la Dilución intermedia	Diluir con el Diluyente final en	Dosis final	N ° Concentración
1 mL	50 mL	3,2 mL	10 mL	6,4 µg/mL	ST 1
		4,0 mL	10 mL	8,0 µg/mL	ST 2
		5,0 mL	10 mL	10,0 µg/mL	ST 3
		6,2 mL	10 mL	12,4 µg/mL	ST 4
		7,6mL	10 mL	15,2 µg/mL	ST 5

4.3.5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PROBLEMA (MP)

Se pesó la MP, asignándole una potencia dada por unidad de peso de forma teórica en concordancia con la información disponible de la muestra que se va analizar y se diluyó en similares condiciones al estándar hasta llegar a una concentración que de acuerdo a la información disponible sería en hipótesis similar al ST 3. Sólo esta concentración de MP se requirió para el ensayo en la curva estándar.

4.3.6. ORGANISMO DE PRUEBA, PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL INÓCULO

Antes de definir el microorganismo a utilizar se realizaron pruebas previas de susceptibilidad al antibiótico tilosina con los microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 9144, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Obteniendo una mejor zona de inhibición el microorganismo *Kocuria rhizophila* ATCC 9341.

4.3.6.1. Activación del organismo de prueba

Se sembró la cepa *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 en un contenedor adecuado con agar antibiótico N° 1, que fue incubado a $35 \pm 0,5$ °C por 24 horas, en un frasco Roux. La siembra se realizó en la superficie de 250mL del medio agar antibiótico N° 1.²⁶

Se recolectó el crecimiento superficial de cultivo con 3 mL de solución salina 0,9% estéril, se diseminó la suspensión en forma pareja sobre la superficie del

agar en el frasco *Roux* con ayuda de las perlas de vidrio estériles. Luego, se colocó en un tubo estéril.

4.3.6.2. Preparación del Inóculo

Para el ensayo, se recogió una porción de la suspensión madre adicionando solución salina estéril. Para el control del inóculo se ajusta la densidad aproximadamente a 6×10^8 UFC/mL, esta turbidez es comparable con la escala Mac Farland N° 2. Se agregó solución salina hasta llegar a esta concentración

Se comprobó la absorbancia de la suspensión, similar a la escala de Mac Farland N° 2 (0,7028 unidades), con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530nm, usando como blanco la absorbancia de la solución salina estéril utilizada también para la dilución del inóculo, para obtener una óptima relación dosis-respuesta.

4.3.7. ACONDICIONAMIENTO DEL INÓCULO EN LAS PLACAS PETRI

De los 300 mL del medio antibiótico n° 11 sin inocular, se agregó 10,0 mL a cada placa Petri previamente esterilizada.

Se dejó solidificar la primera capa base de las placas Petri por espacio de 15 minutos, hasta formar una capa base lisa de profundidad uniforme.⁶

Del preparado de inóculo, se adicionó 6,0 mL de esta suspensión a 400 mL del agar antibiótico N° 11 esterilizado, se agitó hasta lograr una mezcla homogénea (Temperatura entre 45 °C – 50 °C), formando el medio inoculado.

Se adicionó 11,0 mL del medio antibiótico N° 11 inoculado sobre esta primera capa en las placas Petri.

Se uniformizó y dejó solidificar por espacio de 30 minutos, para formar la segunda capa.

4.4. PROCEDIMIENTO

Se etiquetó las placas apropiadamente para reconocer las concentraciones correspondientes a los estándares y la muestra problema.

Se utilizó cuatro placas por cada concentración (S1 a S5 - MP).

Se tomó 4 puntos equidistantes en la placa y se marcaron para usarse como guías de referencia para la formación de las excavaciones.

Se trabajó con 4 placas Petri para cada concentración de estándar (S_1 a S_5) y 4 placas Petri para las muestras Problema (MP).

Con un sacabocado de acero inoxidable esterilizado de 4 mm diámetro, las excavaciones fueron realizadas en la superficie inoculada de cada placa Petri.

Se realizaron con cuidado y uniformemente 4 excavaciones en el agar solidificado, de modo que, perfore la superficie del agar inoculado; se empleó una guía mecánica u otro dispositivo para asegurar una separación uniforme en un radio de 2,8cm y cubrir las placas para evitar la contaminación.

Para derivar la curva estándar, se llenó 20 μ L de dilución media (S_3) del estándar en dos excavaciones alternas por cada placa inoculada (en las placas designadas para las diluciones del estándar). En las otras dos excavaciones de cada placa; colocar 20 μ L de las otras diluciones del estándar (S_1 , S_2 , S_3 , S_4 y S_5).

Para el ensayo de 5 niveles o concentración de estándar se ha requerido solamente de un nivel o de muestra ha ensayar, con una concentración considerada de igual nivel de la dilución media del estándar (S_3).

En cada placa para la valoración de la Muestra Problema se llenó en dos excavaciones alternas 20 μ L de la dilución de dilución media (S_3) del estándar y luego en las otras dos excavaciones alternas restantes la dilución de prueba de la muestra. (Ver esquema 1, 2, 3).

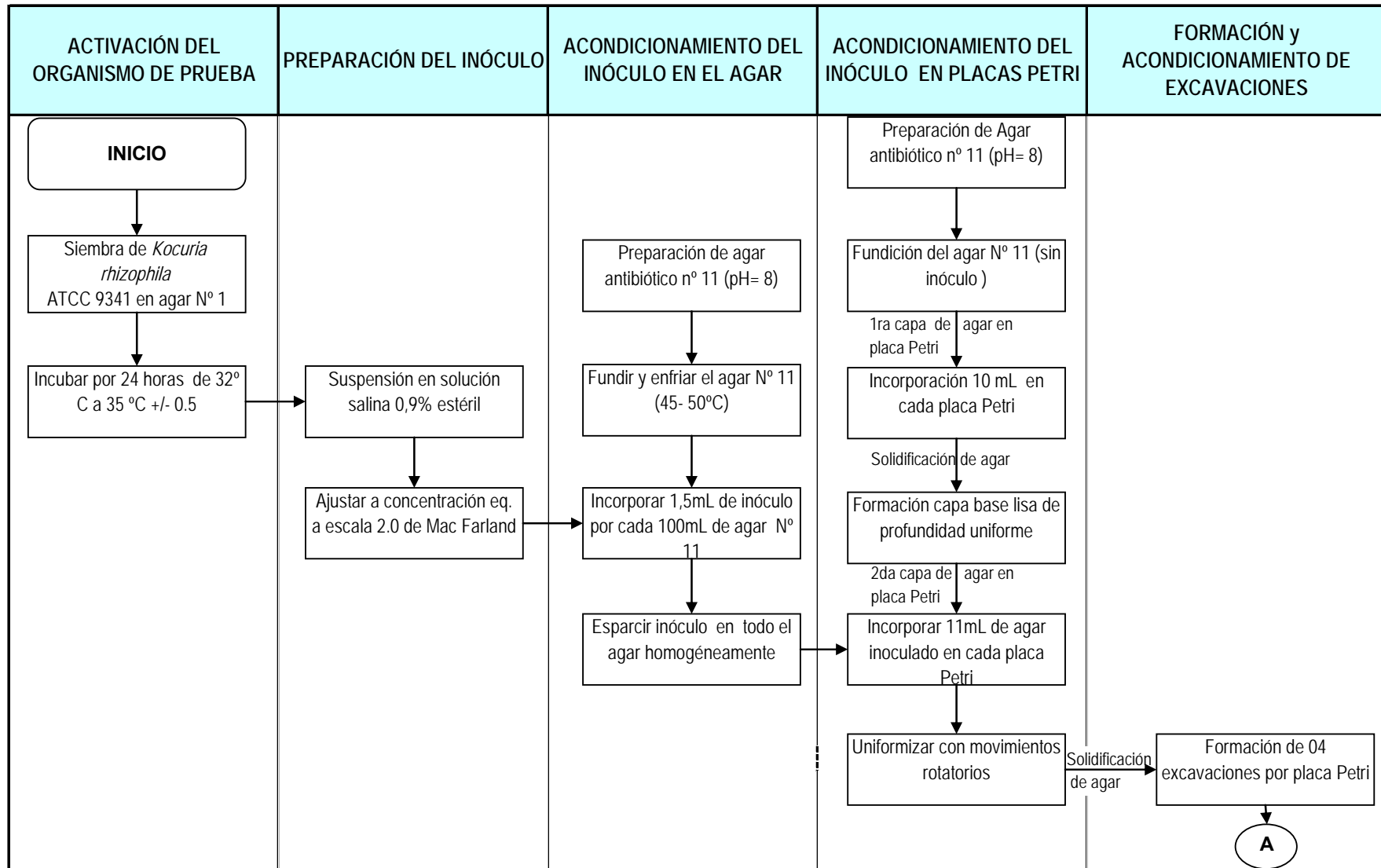
Una vez llenas las 4 excavaciones en cada placa con las diluciones del estándar y la muestra, se deja difundir el antibiótico en el agar por un tiempo adecuado (6- 8 horas) a una temperatura de 4 °C, luego se incuba las placas a una temperatura entre 35 a 37°C, durante 24 horas.

Luego, con un halómetro o dispositivo adecuado se midió y registró el diámetro de cada zona de inhibición de crecimiento con una aproximación de 0,1mm.

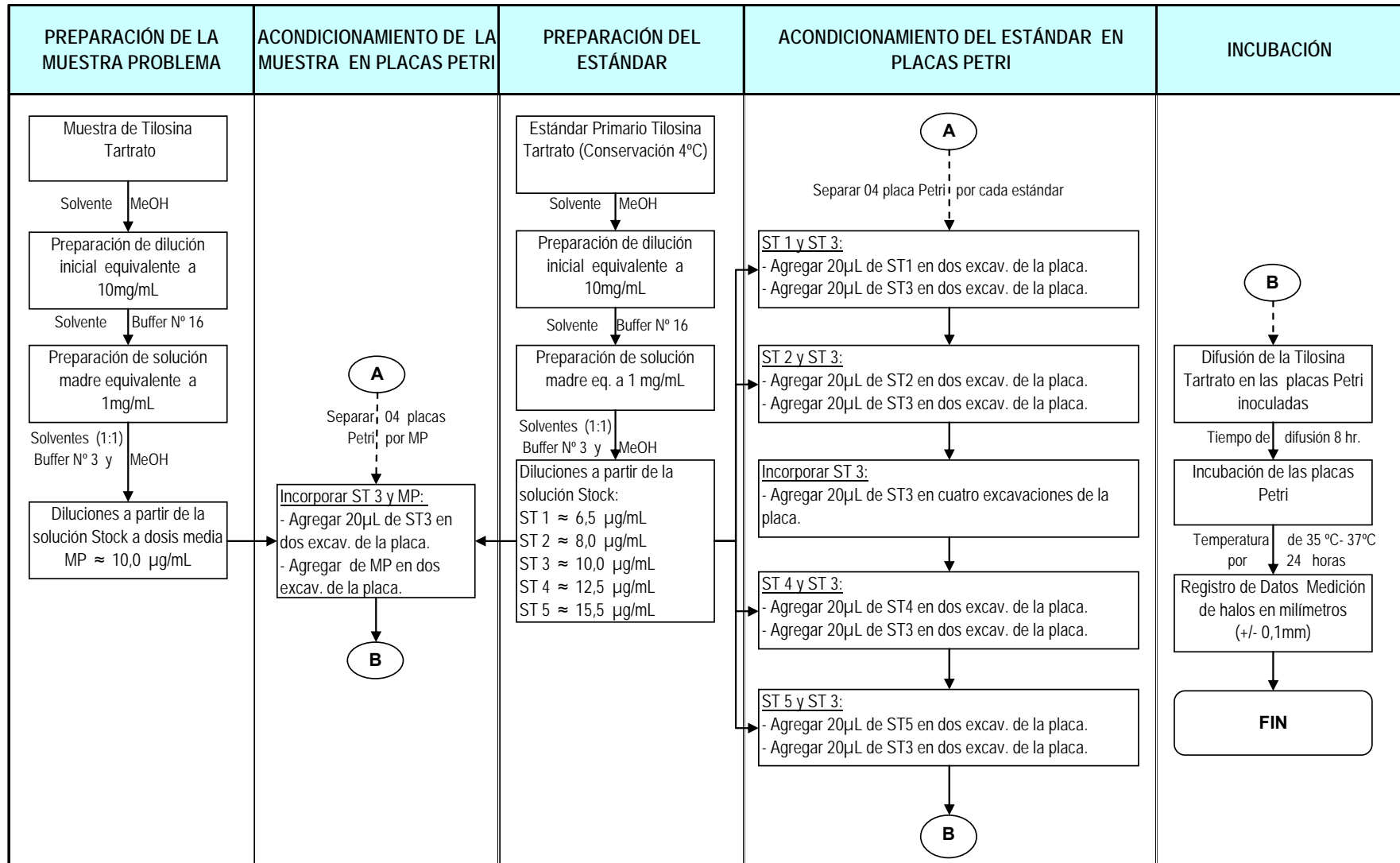
4.4.1. CURVA DEL ESTÁNDAR

La curva estándar se calculó de las zonas de inhibición producidas por una serie de concentración de antibióticos que han sido previamente probadas en las placas específicamente para el antibiótico Tilosina Tartrato Estándar. Se obtuvo 5 niveles de dilución del estándar (ST1 a ST5) para hacer la curva estándar. La concentración media, designada como estándar de Referencia (ST3), se colocó en las placas Petri junto con las muestras desconocidas para el análisis cuantitativo y es el punto de la comparación entre el análisis cuantitativo y la curva estándar.

FLUJOGRAMA N° 1
PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL INÓCULO *Kocuria rhizophila* ATCC 9341



FLUJOGRAMA N° 2
PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR, MUESTRA PROBLEMA Y ACONDICIONAMIENTO EN LAS PLACAS PETRI



V. RESULTADOS

En las tres muestras analizadas se calcularon las curvas estándar utilizando el gráfico semi-logarítmico (usando los valores corregidos), con los diámetros de la zona en la escala aritmética y las concentraciones antibióticos en la escala logarítmica.

En cada ensayo se aplicó un factor de corrección para compensar las variaciones entre las placas. Cada valor de las concentraciones de los estándares (a excepción del ST 3 de referencia) se calcularon de un sistema de 4 placas.

El ST 3 es la referencia para todas las placas y fue promediado por cada sistema de placa.

Para cada sistema placas:

- a) Se hizo un promedio de las lecturas de las ocho zonas del ST3 de referencia (promedio parcial).
- b) Luego, el valor de este promedio parcial fue restado del promedio acumulativo (total) del ST3 de referencia, siendo el valor resultante el factor de corrección.
- c) Se realizó el promedio de las ocho lecturas de cada sistema de placas
- d) Algebraicamente se agregó el factor de corrección a los promedio de lecturas en cada sistema.

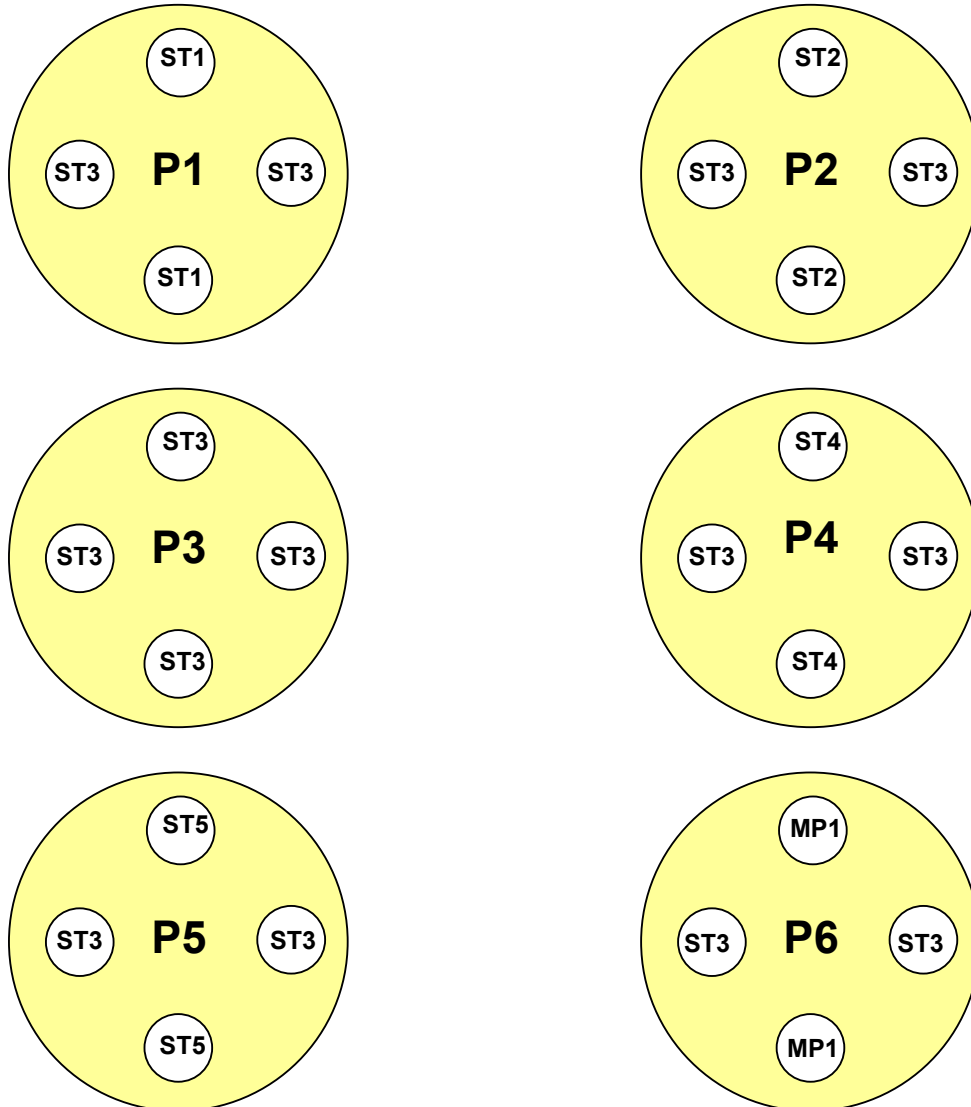
Se utilizó la regresión lineal, para los valores calculados en el análisis cuantitativo de las muestras de la prueba, método de línea recta con cuadrados mínimos y una prueba de linealidad.

Para los cálculos de la potencia se consideró que la especificación de la potencia tilosina tartrato no debe ser menor de 800 µg por mg.²⁶

**5.1. DETERMINACIÓN DE POTENCIA ANTIBIÓTICA DE TILOSINA TARTRATO
POR MÉTODO DE EXCAVACIÓN EN AGAR - MUESTRA PROBLEMA N° 1**

CUADRO N° 1		
LOTE :	:	A
FECHA DE VENCIMIENTO	:	Abril 2010
FECHA DE ANÁLISIS	:	Enero 2008
MEDIO	:	Medio antibiótico N° 11
pH DEL MEDIO	:	8
MICROORGANISMO	:	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341
ESTÁNDAR PRIMARIO	:	Tilosina tartrato USP Potencia 917 µg/mg
DILUYENTE INICIAL (10mg/mL)	:	Metanol
DILUYENTE INTERMEDIO (1mg/mL)	:	Buffer N° 16 (pH=7)
DILUYENTE FINAL	:	Metanol, Buffer N °3 - pH=8 (vol1: 1)
CONCENTRACIÓN MEDIA	:	10,0 µg/mL
PESO DE LA MUESTRA (MP 1)	:	1 012,0 mg
PESO DEL ESTÁNDAR (ST)	:	1 010,3 mg
SOLUCIÓN STOCK (ST Y MP)		
DILUCIÓN STOCK = 1 000µg//mL = $\frac{\text{Peso mg}}{100\text{mL}} \times \frac{1\text{mL}}{10\text{mL}} \times (\text{Potencia } \mu\text{g//mg})$		

ESQUEMA N° 1
ESQUEMA DE TRABAJO PARA EL MÉTODO DE EXCAVACIÓN
DETERMINACIÓN DE POTENCIA ANTIBIOTICA DE TILOSINA



Microorganismo de Ensayo : *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

Estándar : Tilosina tartrato USP

Placas (P)

P1 Comparación de ST1 con ST3
P2 Comparación de ST 2 con ST3
P3 Comparación de ST 3 con ST3
P4 Comparación de ST 4 con ST3
P5 Comparación de ST 5 con ST3
P6 Comparación de MP1 con ST3
 µg/mL

Concentraciones

ST1 Estándar en solución 6,4 µg/mL
ST2 Estándar en solución 8,0 µg/mL
ST3 Estándar en solución 10,0 µg/mL
ST4 Estándar en solución 12,4 µg/mL
ST5 Estándar en solución 15,2 µg/mL
MP1 Muestra Problema en solución 10,0

TABLA N° 2
DIÁMETROS DE HALOS (mm) Y DETERMINACIÓN DE POTENCIA ANTIBIÓTICA DE TILOSINA LOTE A
METODO DE EXCAVACIÓN EN AGAR

Fecha de Analisis	enero-08	Peso de tilosina tartrato estándar:	1,0103 g
Microorganismo	<i>Kocuria rhizophila ATCC 9341</i>	Potencia tilosina tartrato estándar:	917 ug/mg
Lote Muestra Problema:	A	Concentraci3n de soluci3n madre ST:	9,2645 mg/mL

		Concentraci3n ug/mL	Lecturas Punto de Referencia ST3 en mm.								Promedio Parcial	Promedio Total	Factor de Correcci3n	Lectura de STn en mm.								Promedio	Promedio Corregido
TIL																							
ST 1	1	5,9290	8,00	8,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,2500	7,1042	-0,1458	4,00	5,50	4,00	5,00	4,00	4,00	5,50	4,00	4,5000	4,3542
ST 2	2	7,4116	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	8,00	7,1250		-0,0208	6,00	6,00	5,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,8750	5,8542
ST 3	3	9,2640	7,00	7,00	6,50	7,00	7,00	7,00	6,50	7,00	6,8750		0,2292	7,00	6,00	6,50	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	6,8125	7,0417
ST 4	4	11,4879	8,00	8,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,2500		-0,1458	9,00	9,00	8,50	7,50	9,00	7,00	9,00	9,00	8,5000	8,3542
ST 5	5	14,2673	8,00	8,00	6,00	6,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,0000		0,1042	11,00	10,00	11,00	8,50	9,50	9,50	10,00	10,00	9,9375	10,0417
MP 1	1	10,1830	7,00	7,00	6,50	7,50	8,00	7,50	7,00	6,50	7,1250		-0,0208	8,00	7,00	7,00	6,00	7,00	8,00	7,00	8,00	7,2500	7,2292

Leyenda

TIL : Tilosina
ST : est3ndar
MP : Muestra Problema
ug : Microgramos
STn : ST1 a ST 5

C3LCULOS :

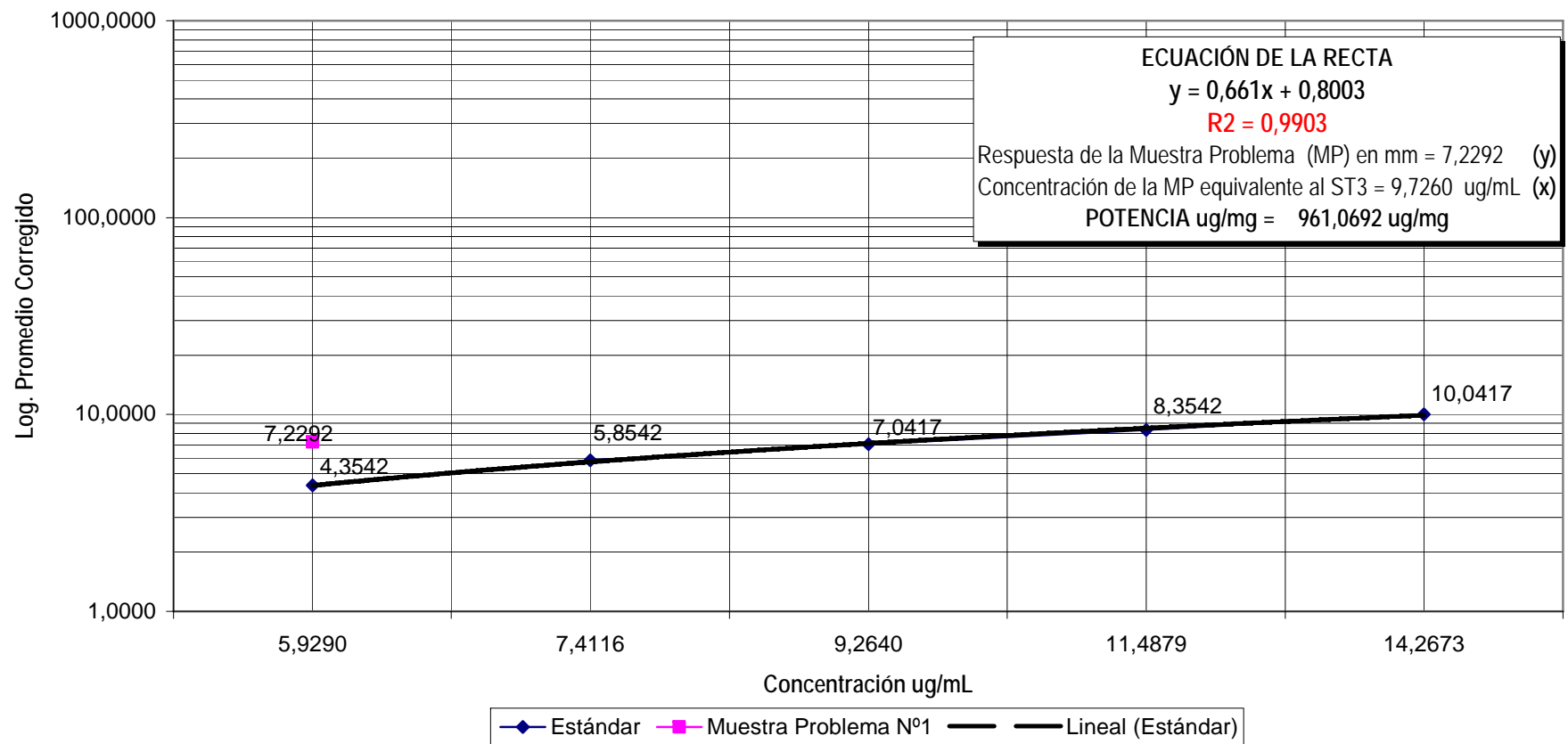
$$\text{POTENCIA (ug/mg)} = \frac{\text{Concentraci3n final de la MP}}{\text{Peso de la MP}} \times \frac{x 10}{x 1} \times \frac{x 50}{x 1} \times \frac{x 10}{x 5} \times \frac{x 50}{x 5}$$

RESULTADO = 961,0692 ug/mg

$$\text{POTENCIA} = \frac{\text{Potencia MP}}{\text{Potencia ST}} \times 100$$

RESULTADO = 104,8058 %

MUESTRA PROBLEMA N° 1



5.1.1. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

5.1.1.1 Linealidad y Rango

A. CÁLCULO DE LA RECTA DE REGRESIÓN:

Se determinó la curva de regresión, sobre los puntos estándar individuales promediados. Para el caso de una recta la función toma la forma de:

$$Y = bX + a$$

Donde:

X : Concentración del analito (Variable independiente)

Y : Respuesta (variable dependiente)

b : Valor de la pendiente

a : Término independiente (intercepto, estimador de la ordenada de origen)

Fórmula para hallar "a"

$$a = \frac{\sum Y - b \sum X}{n}$$

Fórmula para hallar "b"

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

n= numero de muestras

Valores obtenidos:

De la tabla N° 2 se obtuvieron los siguientes valores:

$$a = 0,8003$$

$$b = 0,661$$

(Ver gráfico N° 1)

Ecuación de la recta: $Y = 0,661X + 0,8003$

B. INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REGRESIÓN LINEAL:

B.1. Cálculo del coeficiente de correlación (r)

Se determinó para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto $y = bx + a$

Y refleja el grado de relación entre las concentraciones (X) y sus respuestas (Y).

Fórmula para hallar "r"

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n})}}$$

El valor de:

$r = 1$ indica una recta perfectamente lineal.

$r = -1$ indica una recta perfectamente lineal negativa.

$r = 0$ indica que no hay correlación entre X e Y.

Valor obtenido: $r = 0,99951$

B.2. Cálculo del coeficiente de determinación " r^2 "

Indica el grado de ajuste de la ecuación. La especificación: $r^2 \geq 0,95$

Valor obtenido: $r^2 = 0,9903$

Interpretación: El 99,03% de las variaciones se debe a la influencia de la variable "X" (concentración del analito).

5.1.1.2 Precisión

A. DETERMINACIÓN DEL INTERVALO DE CONFIANZA:

Para la estimación del intervalo, el cual consta de dos valores numéricos (LCI, y LCS) que definen el intervalo, se consideró el nivel confianza 0,95; referido por la USP.

LCS: Límite superior del contenido del analito (Especificación)

LCI : Límite inferior del contenido del analito (Especificación)

A.1. Cálculos Generales

Fórmula para hallar "L"

$$L = 2st / \sqrt{k}$$

Donde:

L : Amplitud del intervalo de confianza en logaritmos

s : Desviación estándar.

t . t de Student para n grados de libertad en s. Ver anexo 8

k : Es el número de estimaciones que se han promediado.

Valor obtenido: $L = 0.01567$

A.2. Límite de confianza Superior

Fórmula para hallar "LCS"

$$\mathbf{LCS = M + L/2}$$

Donde:

M : Logaritmo de la Potencia.

L/2: Mitad del intervalo de confianza hallado.

Valor Obtenido: LCS = 1,0671

A.3. Límite de confianza Inferior

Fórmula para hallar "LCI"

$$\mathbf{LCI = M - L/2}$$

Donde:

M : Logaritmo de la Potencia.

L/2: Mitad del intervalo de confianza hallado.

Valor Obtenido: LCI = 1,0293

B. INTERPRETACIÓN:

La precisión del ensayo es tal que el límite fiducial del error no es menor del 95% y no mayor del 105% de la potencia estimada.⁶

Intervalo de confianza **acceptable** según especificación: 99,56% - 110,05%

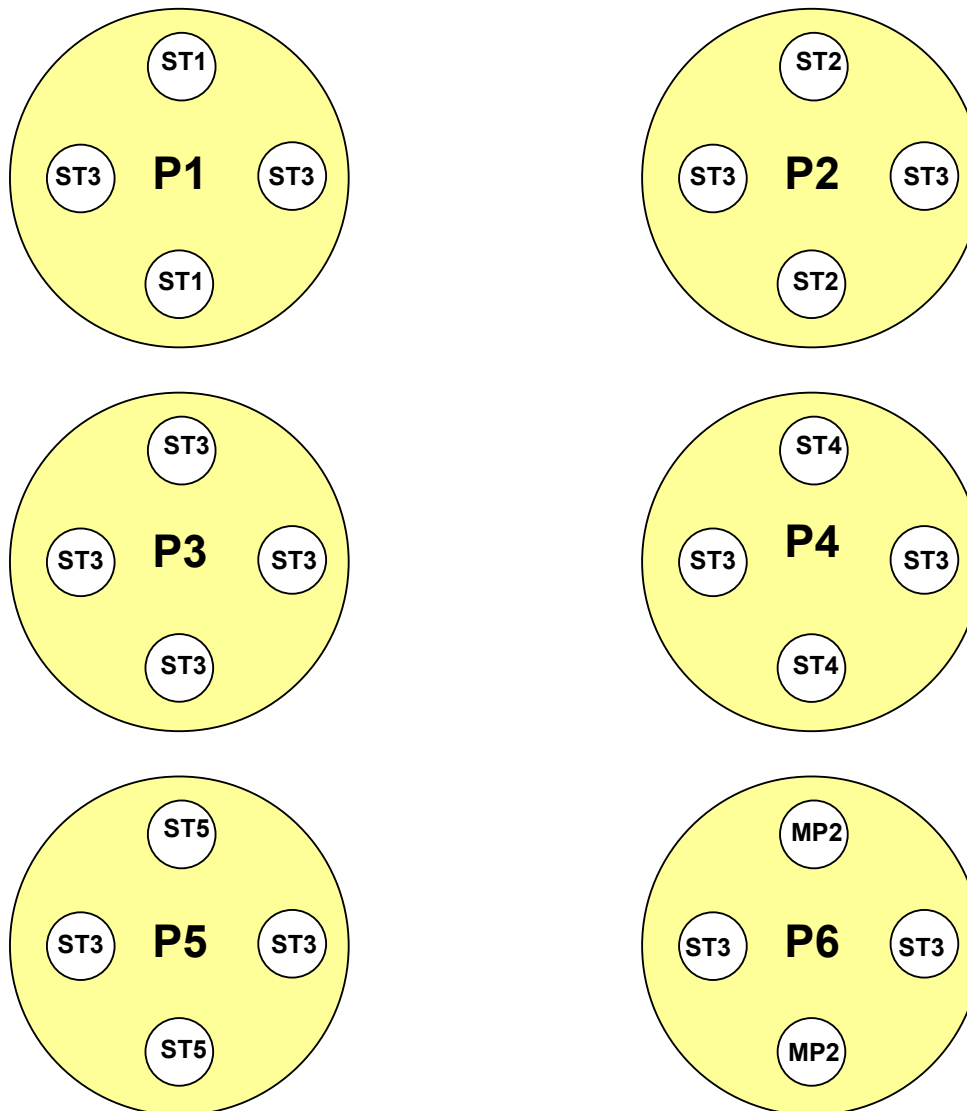
Valores obtenidos: 102,93% - 106,71%

Interpretación: Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de especificado.

5.2. DETERMINACIÓN DE POTENCIA ANTIBIÓTICA DE TILOSINA TARTRATO POR MÉTODO DE EXCAVACIÓN EN AGAR -MUESTRA PROBLEMA Nº 2.

CUADRO Nº 2		
LOTE :	:	B
FECHA DE VENCIMIENTO	:	Octubre 2008
FECHA DE ANÁLISIS	:	Enero 2008
MEDIO	:	Medio antibiótico Nº 11
pH DEL MEDIO	:	8
MICROORGANISMO	:	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341
ESTÁNDAR PRIMARIO	:	Tilosina tartrato USP Potencia 917 µg/mg
DILUYENTE INICIAL (10mg/mL)	:	Metanol
DILUYENTE INTERMEDIO (1mg/mL)	:	Buffer Nº 16 (pH=7)
DILUYENTE FINAL	:	Metanol, Buffer N º3 - pH=8 (vol1: 1)
CONCENTRACIÓN MEDIA	:	10,0 µg/mL
PESO DE LA MUESTRA (MP 2)	:	1 011,60 mg
PESO DEL ESTÁNDAR (ST)	:	1 010,3 mg
SOLUCIÓN STOCK (ST Y MP)		
DILUCIÓN STOCK = 1 000µg//mL = $\frac{\text{Peso mg}}{100\text{mL}} \times \frac{1\text{mL}}{10\text{mL}} \times (\text{Potencia } \mu\text{g//mg})$		

ESQUEMA N° 2
ESQUEMA DE TRABAJO PARA EL MÉTODO DE EXCAVACIÓN
DETERMINACIÓN DE POTENCIA ANTIBIOTICA DE TILOSINA



Microorganismo de Ensayo : *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

Estándar : Tilosina tartrato USP

Placas (P)

- P1** Comparación de ST 1 con ST3
- P2** Comparación de ST 2 con ST3
- P3** Comparación de ST 3 con ST3
- P4** Comparación de ST 4 con ST3
- P5** Comparación de ST 5 con ST3
- P6** Comparación de MP2 con ST3

Concentraciones

- ST1** Estándar en solución 6,4 µg/mL
- ST2** Estándar en solución 8,0 µg/mL
- ST3** Estándar en solución 10,0 µg/mL
- ST4** Estándar en solución 12,4 µg/mL
- ST5** Estándar en solución 15,2 µg/mL
- MP2** Estándar en solución 10,0 µg/mL

TABLA Nº 3
DIÁMETROS DE HALOS (mm) Y DETERMINACIÓN DE POTENCIA ANTIBIÓTICA DE TILOSINA LOTE B
METODO DE EXCAVACIÓN EN AGAR

Fecha de Analisis enero-08 Peso de tilosina tartrato estándar: 1,0103 g
 Microorganismo *Kocuria rhizophila ATCC 9341* Potencia tilosina tartrato estándar: 917 ug/mg
 Lote Muestra Problema: B Concentracion de solucion madre ST: 9,2645 mg/mL

TIL	Concentración ug/mL	Lecturas Punto de Referencia ST3 en mm.								Promedio Parcial	Promedio Total	Factor de Corrección	Lectura de STn en mm.								Promedio	Promedio Corregido
ST 1	5,9290	8,00	8,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,2500	7,1563	-0,0938	4,00	5,50	4,00	5,00	4,00	4,00	5,50	4,00	4,5000	4,4063
ST 2	7,4116	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	8,00	7,1250		0,0313	6,00	6,00	5,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,8750	5,9063
ST 3	9,2640	7,00	7,00	6,50	7,00	7,00	7,00	6,50	6,50	6,8125		0,3438	7,00	6,00	6,50	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	6,8125	7,1563
ST 4	11,4879	8,00	8,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,2500		-0,0938	9,00	9,00	8,50	7,50	9,00	7,00	9,00	9,00	8,5000	8,4063
ST 5	14,2673	8,00	8,00	6,00	6,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,0000		0,1563	11,00	10,00	11,00	8,50	9,50	9,50	10,00	10,00	9,9375	10,0938
MP 2	9,2375	7,00	7,00	7,00	8,00	8,00	8,00	7,00	8,00	7,5000		-0,3438	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	8,00	7,00	8,00	7,2500	6,9063

Leyenda

TIL : Tilosina
 ST : estándar
 MP : Muestra Problema
 ug : Microgramos
 STn : ST1 a ST 5

CÁLCULOS :

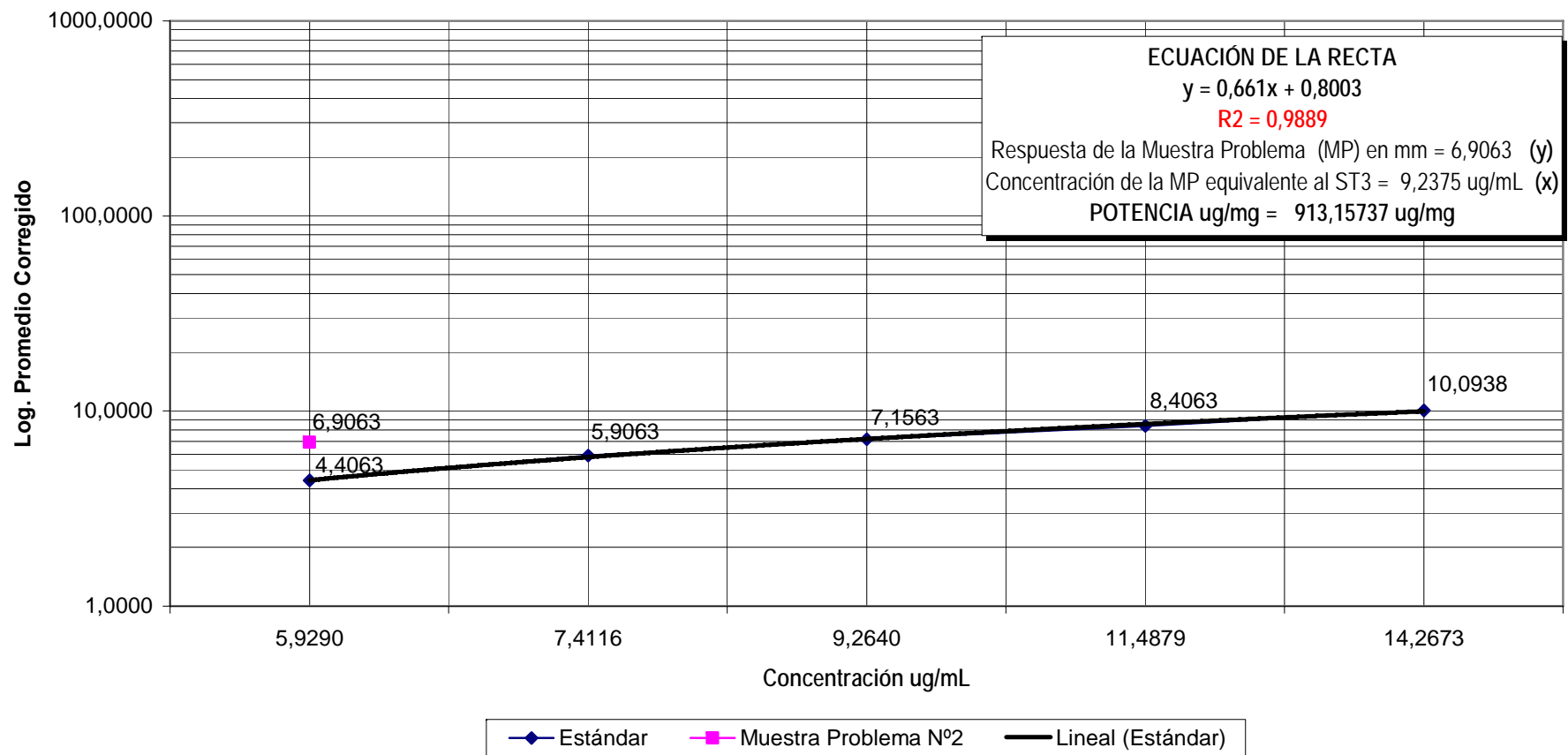
$$\text{POTENCIA (ug/mg)} = \frac{\text{Concentración final de la MP} \times 10 \times 50 \times 10 \times 50}{\text{Peso de la MP} \times 1 \times 1 \times 5}$$

RESULTADO = 913,1573 ug/mg

$$\text{POTENCIA} = \frac{\text{Potencia MP} \times 100}{\text{Potencia ST}}$$

RESULTADO = 99,5809 %

GRÁFICA N° 2
INTERPOLARIDAD CURVA ESTÁNDAR
MUESTRA PROBLEMA N° 2



5.2.1. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

5.2.1.1 Linealidad y Rango

A. CÁLCULO DE LA RECTA DE REGRESIÓN:

Se determinó la curva de regresión, sobre los puntos estándar individuales promediados. Para el caso de una recta la función toma la forma de:

$$Y = bX + a$$

Donde:

X : Concentración del analito (Variable independiente)

Y : Respuesta (variable dependiente)

b : Valor de la pendiente

a : Término independiente (intercepto, estimador de la ordenada de origen)

Fórmula para hallar "a"

$$a = \frac{\sum Y - b \sum X}{n}$$

Fórmula para hallar "b"

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

n= numero de muestras

Valores obtenidos:

De la tabla N° 3 se obtuvieron los siguientes valores:

$$a = 0,8003$$

$$b = 0,661$$

(Ver gráfico N° 2)

Ecuación de la recta: $Y = 0,661X + 0,8003$

B. INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REGRESIÓN LINEAL:

B.1. Cálculo del coeficiente de correlación (r)

Se determinó para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto $y = bx + a$

Y refleja el grado de relación entre las concentraciones (X) y sus respuestas (Y).

Fórmula para hallar "r"

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n})}}$$

El valor de:

$r = 1$ indica una recta perfectamente lineal.

$r = -1$ indica una recta perfectamente lineal negativa.

$r = 0$ indica que no hay correlación entre X e Y.

Valor obtenido: $r = 0,9944$

B.2. Cálculo del coeficiente de determinación " r^2 "

Indica el grado de ajuste de la ecuación. La especificación: $r^2 \geq 0,95$

Valor obtenido: $r^2 = 0,9889$

Interpretación: El 98,89% de las variaciones se debe a la influencia de la variable "X" (concentración del analito).

5.2.1.2 Precisión

A. DETERMINACIÓN DEL INTERVALO DE CONFIANZA:

Para la estimación del intervalo, el cual consta de dos valores numéricos (LCI, y LCS) que definen el intervalo, se consideró el nivel confianza 0,95; referido por la USP.

LCS: Límite superior del contenido del analito (Especificación)

LCI : Límite inferior del contenido del analito (Especificación)

A.1. Cálculos Generales

Fórmula para hallar "L"

$$L = 2st / \sqrt{k}$$

Donde:

L : Amplitud del intervalo de confianza en logaritmos

s : Desviación estándar.

t . t de Student para n grados de libertad en s. Ver anexo 8

k : Es el número de estimaciones que se han promediado.

Valor obtenido: $L = 0.01026$

A.2. Límite de confianza Superior

Fórmula para hallar "LCS"

$$\text{LCS} = M + L/2$$

Donde:

M : Logaritmo de la Potencia.

L/2: Mitad del intervalo de confianza hallado.

Valor Obtenido: LCS = 1,00764

A.3. Límite de confianza Inferior

Fórmula para hallar "LCI"

$$\text{LCI} = M - L/2$$

Donde:

M : Logaritmo de la Potencia.

L/2: Mitad del intervalo de confianza hallado.

Valor Obtenido: LCI = 0,9841

B. INTERPRETACIÓN:

La precisión del ensayo es tal que el limite fiducial del error no es menor del 95% y no mayor del 105% de la potencia estimada.⁶

Intervalo de confianza **acceptable** según especificación: 94,60% - 104,56%

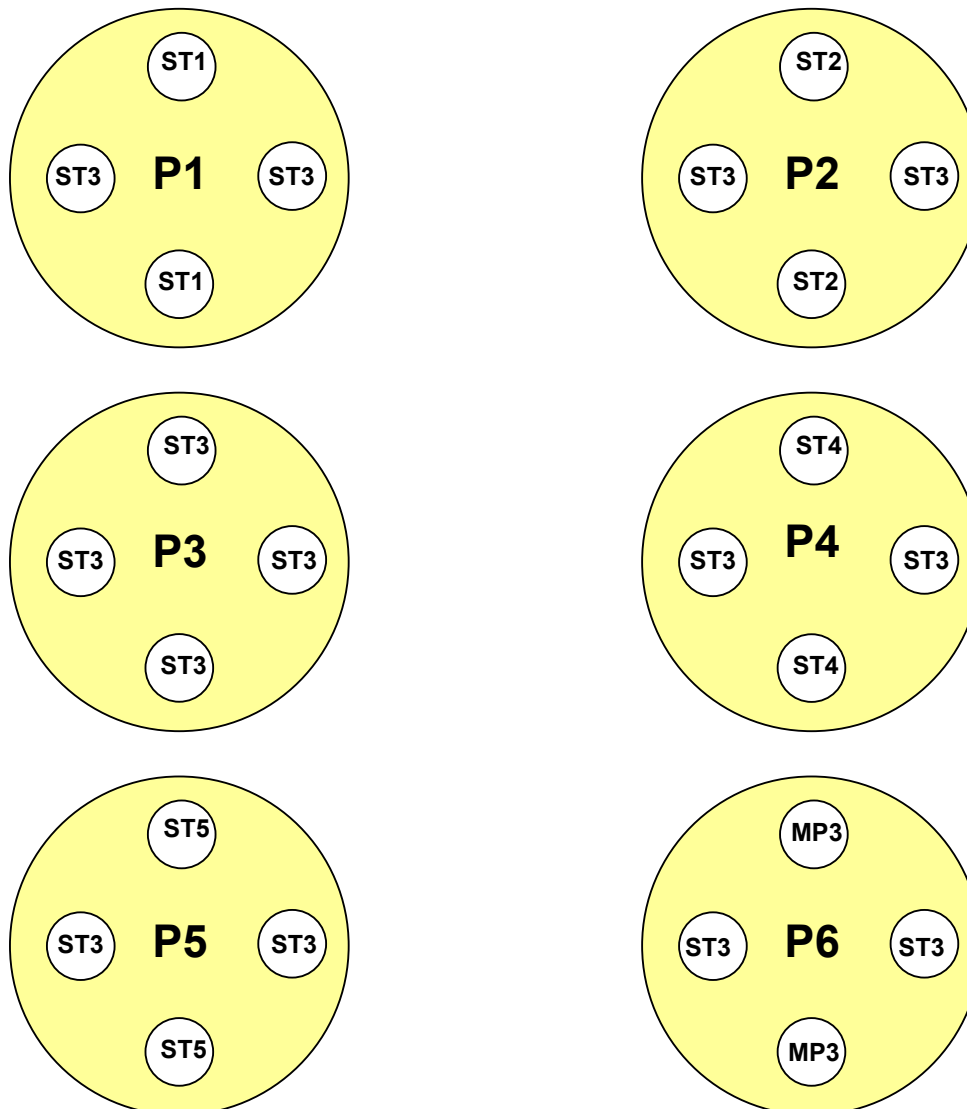
Valores Obtenidos: 98,41% - 100,76%

Interpretación: Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de especificado.

5.3. DETERMINACIÓN DE POTENCIA ANTIBIÓTICA DE TILOSINA TARTRATO POR MÉTODO DE EXCAVACIÓN EN AGAR -MUESTRA PROBLEMA N° 3

CUADRO N° 3		
LOTE :	:	C
FECHA DE VENCIMIENTO	:	Mayo 2009
FECHA DE ANÁLISIS	:	Enero 2008
MEDIO	:	Medio antibiótico N° 11
pH DEL MEDIO	:	8
MICROORGANISMO	:	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341
ESTÁNDAR PRIMARIO	:	Tilosina tartrato USP Potencia 917 µg/mg
DILUYENTE INICIAL (10mg/mL)	:	Metanol
DILUYENTE INTERMEDIO (1mg/mL)	:	Buffer N° 16 (pH=7)
DILUYENTE FINAL	:	Metanol, Buffer N °3 - pH=8 (vol1: 1)
CONCENTRACIÓN MEDIA	:	10,0 µg/mL
PESO DE LA MUESTRA (MP 3)	:	1 012,0 mg
PESO DEL ESTÁNDAR (ST)	:	1 010,3 mg
SOLUCIÓN STOCK (ST Y MP)		
$\text{DILUCIÓN STOCK} = 1\,000\mu\text{g//mL} = \frac{\text{Peso mg}}{100\text{mL}} \times \frac{1\text{mL}}{10\text{mL}} \times (\text{Potencia } \mu\text{g//mg})$		

ESQUEMA N° 3
ESQUEMA DE TRABAJO PARA EL MÉTODO DE EXCAVACIÓN
DETERMINACIÓN DE POTENCIA ANTIBIOTICA DE TILOSINA



Microorganismo de Ensayo : *Kocuria rhizophila* ATCC 9341
Estándar : Tilosina tatrato USP

Placas (P)
P1 Comparación de ST 1 con ST3
P2 Comparación de ST 2 con ST3
P3 Comparación de ST 3 con ST3
P4 Comparación de ST 4 con ST3
P5 Comparación de ST 5 con ST3
P6 Comparación de MP3 con ST3

Concentraciones
ST1 Estándar en solución 6,4 µg/mL
ST2 Estándar en solución 8,0 µg/mL
ST3 Estándar en solución 10,0 µg/mL
ST4 Estándar en solución 12,4 µg/mL
ST5 Estándar en solución 15,2 µg/mL
MP3 Estándar en solución 10,0 µg/mL

TABLA N° 4
DIÁMETROS DE HALOS (mm) Y DETERMINACIÓN DE POTENCIA ANTIBIÓTICA DE TILOSINA LOTE C
METODO DE EXCAVACIÓN EN AGAR

Fecha de Analisis	enero-08	Peso de tilosina tartrato estándar:	1,0103 g
Microorganismo	<i>Kocuria rhizophila ATCC 9341</i>	Potencia tilosina tartrato estándar:	917 ug/mg
Lote Muestra Problema:	C	Concentraciòn de soluciòn madre ST:	9,2645 mg/mL

TIL		Concentraciòn ug/mL	Lecturas Punto de Referencia ST3 en mm.								Promedio Parcial	Promedio Total	Factor de Correcciòn	Lectura de STn en mm.								Promedio	Promedio Corregido
ST	1	5,9290	7,00	8,00	7,00	7,00	8,00	7,00	7,00	7,00	7,2500	7,1563	-0,0938	4,50	5,00	4,00	4,00	5,00	4,50	5,00	4,00	4,5000	4,4063
ST	2	7,4116	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	8,00	7,1250		0,0313	6,00	6,00	5,50	6,00	6,00	6,00	5,50	6,00	5,8750	5,9063
ST	3	9,2640	7,00	7,00	6,50	7,00	6,50	7,00	7,00	6,50	6,8125		0,3438	7,00	6,50	7,00	7,00	7,00	6,50	7,00	6,50	6,8125	7,1563
ST	4	11,4879	8,00	8,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,2500		-0,0938	9,00	8,50	8,00	7,50	9,00	8,00	9,00	9,00	8,5000	8,4063
ST	5	14,2673	7,50	8,00	7,00	6,50	7,00	7,00	6,00	7,00	7,0000		0,1563	10,00	10,00	11,00	10,00	11,00	9,50	8,50	9,50	9,9375	10,0938
MP	3	9,8048	7,00	6,50	7,50	8,00	8,00	8,00	7,50	7,50	7,5000		-0,3438	8,00	8,50	8,00	8,00	8,00	7,00	7,00	6,50	7,6250	7,2813

Leyenda

TIL : Tilosina
ST : estándar
MP : Muestra Problema
ug : Microgramos
STn : ST1 a ST 5

CÁLCULOS :

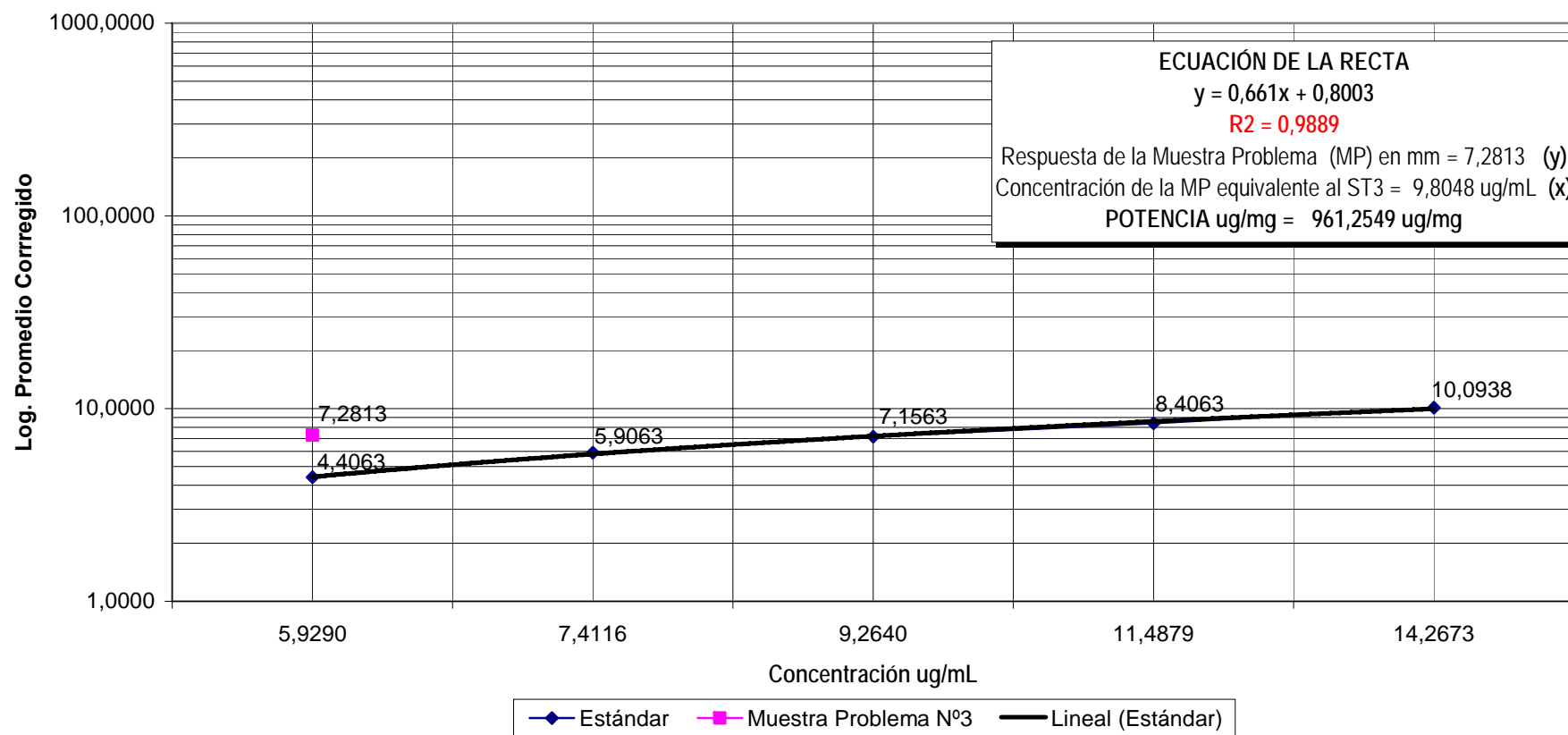
$$\text{POTENCIA (ug/mg)} = \frac{\text{Concentraciòn final de la MP}}{\text{Peso de la MP}} \times \frac{10}{1} \times \frac{50}{1} \times \frac{10}{5} \times \frac{50}{5}$$

RESULTADO = **961,2549 ug/mg**

$$\text{POTENCIA} = \frac{\text{Potencia MP}}{\text{Potencia ST}} \times 100$$

RESULTADO = **104,826 %**

GRÁFICA N° 3
INTERPOLARIDAD CURVA ESTÁNDAR
MUESTRA PROBLEMA N° 3



5.3.1. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

5.3.1.1 Linealidad y Rango

A. CÁLCULO DE LA RECTA DE REGRESIÓN:

Se determinó la curva de regresión, sobre los puntos estándar individuales promediados. Para el caso de una recta la función toma la forma de:

$$Y = bX + a$$

Donde:

X : Concentración del analito (Variable independiente)

Y : Respuesta (variable dependiente)

b : Valor de la pendiente

a : Término independiente (intercepto, estimador de la ordenada de origen)

Fórmula para hallar "a"

$$a = \frac{\sum Y - b \sum X}{n}$$

Fórmula para hallar "b"

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

n= numero de muestras

Valores obtenidos:

De la tabla N° 4 se obtuvieron los siguientes valores:

$$a = 0,8003$$

$$b = 0,661$$

(Ver gráfico N° 3)

Ecuación de la recta: $Y = 0,661X + 0,8003$

B. INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REGRESIÓN LINEAL:

B.1. Cálculo del coeficiente de correlación (r)

Se determinó para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto $y = bx + a$

Y refleja el grado de relación entre las concentraciones (X) y sus respuestas (Y).

Fórmula para hallar "r"

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}}$$

El valor de:

$r = 1$ indica una recta perfectamente lineal.

$r = -1$ indica una recta perfectamente lineal negativa.

$r = 0$ indica que no hay correlación entre X e Y.

Valor obtenido: $r = 0,9944$

B.2. Cálculo del coeficiente de determinación " r^2 "

Indica el grado de ajuste de la ecuación. La especificación: $r^2 \geq 0,95$

Valor obtenido: $r^2 = 0,9889$

Interpretación: El 98,89% de las variaciones se debe a la influencia de la variable "X" (concentración del analito).

5.2.1.2 Precisión

A. DETERMINACIÓN DEL INTERVALO DE CONFIANZA:

Para la estimación del intervalo, el cual consta de dos valores numéricos (LCI, y LCS) que definen el intervalo, se consideró el nivel confianza 0,95; referido por la USP.

LCS: Límite superior del contenido del analito (Especificación)

LCI : Límite inferior del contenido del analito (Especificación)

A.1. Cálculos Generales

Fórmula para hallar "L"

$$L = 2st / \sqrt{k}$$

Donde:

L : Amplitud del intervalo de confianza en logaritmos

s : Desviación estándar.

t . t de Student para n grados de libertad en s. Ver anexo 8

k : Es el número de estimaciones que se han promediado.

Valor obtenido: $L = 0.015394$

A.2. Límite de confianza Superior

Fórmula para hallar "LCS"

$$\mathbf{LCS = M + L/2}$$

Donde:

M : Logaritmo de la Potencia.

L/2: Mitad del intervalo de confianza hallado.

Valor Obtenido: LCS = 1,06700

A.3. Límite de confianza Inferior

Fórmula para hallar "LCI"

$$\mathbf{LCI = M - L/2}$$

Donde:

M : Logaritmo de la Potencia.

L/2: Mitad del intervalo de confianza hallado.

Valor Obtenido: LCI = 1,0298

B. INTERPRETACIÓN:

La precisión del ensayo es tal que el limite fiducial del error no es menor del 95% y no mayor del 105% de la potencia estimada.⁶

Intervalo de confianza **acceptable** según especificación: 99,58% - 110,07%

Valores Obtenidos: 102,98% - 106,70%

Interpretación: Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de especificado.

5.4. COMPARACIÓN DEL ORGANISMO UTILIZADO, RESULTADOS OBTENIDOS Y METODOLOGÍAS

Ver tablas N° 5, 6 y 7

TABLA N° 5
EVALUACIÓN COMPARATIVA DEL MICROORGANISMO DE PRUEBA PARA LA VALORACIÓN DEL ANTIBIÓTICO
TILOSINA

Organismo	Método	Dosis	Medio	Respuestas obtenidas
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9144	Turbidimétrico	4 µg	N° 39	Tubos estándar de turbidez variable. No presentó curva de valoración adecuada.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29737	Difusión en agar	10 µg	N° 11	Formación de halos no delineados, pequeños en diámetro y en algunas dosis no formó zonas de inhibición.
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Difusión en agar	10 µg	N° 11	No hay una curva adecuada de valoración. Las dosis escogidas dieron una curva sin mucha pendiente, las medidas de los halos de inhibición no dieron mayor diferencia entre la dosis de los estándares. Halos de inhibición de comportamiento variable.
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Difusión en agar	20 µg	N° 11	La dosis media utilizada fue muy alta, no hay mayor diferencia en los diámetros de los halos correspondiente a los ST 4 y ST 5, formando una recta sin pendiente entre las últimas dosis de los estándares.
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC9341	Difusión en agar	10 µg	N° 11	El microorganismo y la dosis escogida para esta valoración presentaron mejores resultados al graficarse la curva de valoración. Halos mejor definidos de diámetros repetitivos.

TABLA N° 6

COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE LAS TRES MUESTRAS VALORADAS POR EL METODO DE EXCAVACIÓN

MUESTRA	RESULTADOS			
	Potencia estimada µg/mg Especificación: > 800 µg/mg	Potencia %	Coef. de determinación Especificación: $r^2 \geq 0.95$	Precisión Especificación: 95% -105% de la potencia estimada
LOTE A	1006.2252	104.8058	0.99	99,56% -110,05% Límites de confianza hallados: 102,93 - 106,71
LOTE B	913.1573	99.5809	0.98	94,60% -104,56% Límites de confianza hallados: 98,41 - 100,76
LOTE C	961.2549	104.826	0.98	99,58% -110,07% Límites de confianza hallados: 102,98 - 106,70

TABLA N° 7
TABLA COMPARATIVA ENTRE LAS CONDICIONES RECOMENDADAS
POR LA FARMACOPEA USP Y LA DETERMINADA DURANTE LA
EVALUACIÓN DE LA POTENCIA ANTIMICROBIANA

CONDICIONES	FARMACOPEA USP	METODO UTILIZADO
DILUCIÓN STOCK		
Diluyente inicial	Metanol	Metanol
Diluyente Posterior	Buffer N° 16	Buffer N° 16
Concentración Inicial	10mg/mL	10mg/mL
Diluyente final	Buffer N°3:Metanol (1:1)	Buffer N°3:Metanol(1:1)
Solución Madre Final	1mg	1mg
Condiciones de Conservación	4°C	4°C
ENSAYO DE DILUCIÓN		
Diluyente	Buffer N°3:Metanol (1:1)	Buffer N°3:Metanol (1:1)
Dosis media	4 µg	10 µg
TIPO DE VALORACIÓN	Turbidimétrico	Difusión en agar
ORGANISMO DE PRUEBA		
Microorganismo (N° ATCC)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9144	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341
Medio para siembra	Medio antibiótico N° 3	Medio antibiótico N° 1
Tiempo de incubación para activación	16 a 18 horas	24 horas
Temperatura de incubación	35-39 °C	32-35 °C
INOCULACIÓN		
Diluyente para suspensión	No refiere	Solución salina 0,9% estéril
Medio para inoculación	Medio N° 39	Medio N° 11
Cantidad de inóculo en el medio	2 -3 mL/100mL	1,5mL/100mL
CANTIDAD DE DOSIS	100µL/ tubo	20µL/ excavación
MUESTRAS DE CONTROL	1 ó 2 tubos sólo con diluyente	No aplica

CONDICIONES	FARMACOPÉA USP	METODO UTILIZADO
TEMPERATURA DE DIFUSIÓN	No aplica	4°C
TIEMPO DE DIFUSIÓN	No aplica	8 Horas
INCUBACIÓN DEL ENSAYO	Baño María	Incubadora
Temperatura de incubación	36 °C – 37,5 °C	35 °C- 37 °C
Tiempo de incubación	3 a 5 Horas	24 horas
Detenimiento de la incubación	Incrementar entre 80 °C- 90 °C	Retiro de la incubadora
Tiempo para detención de la incubación	2 a 6 minutos	Inmediato

DETERMINACION DE POTENCIA ANTIBIOTICA DE TILOSINA (Método de Excavación)

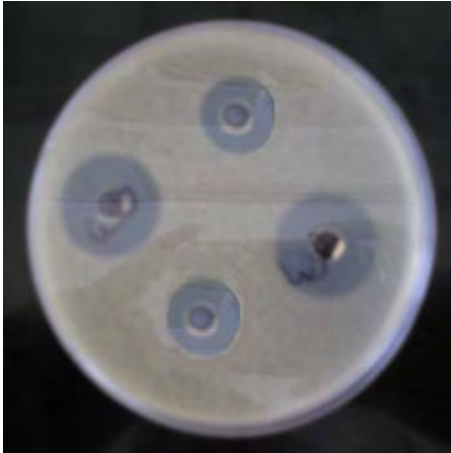


Figura N° 1: Halos de inhibición ST1 vs ST3
ST3

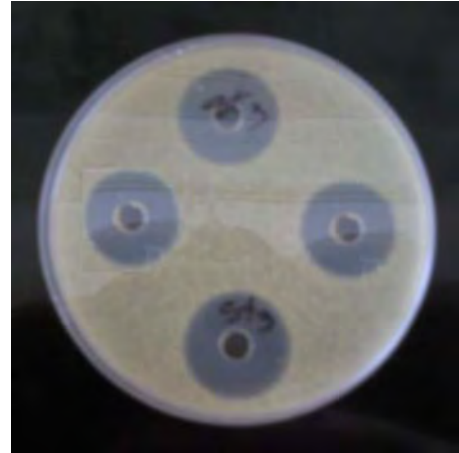


Figura N° 2: Halos de inhibición ST2 vs
ST3



Figura N° 3: Colocación de las excavaciones, se siguió el esquema de trabajo señalado.

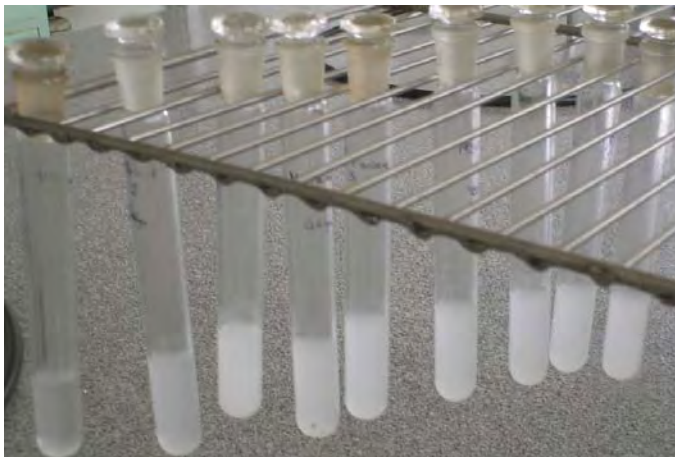


Figura N° 4: Batería de tubos de escala Mac Farland



Figura N° 5: Ajuste de la
suspensión del inóculo con la Sol.
Mac Farland Escala N° 2.

VI. DISCUSIÓN

Durante la evaluación del método de ensayo microbiológico alternativo para la determinación de la potencia antibiótica de Tilosina, no se utilizó el método de valoración turbidimétrico recomendado por la farmacopea de referencia; el cual se basa en la inhibición del crecimiento del microorganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 9144, en una solución uniforme de Tilosina en un medio antibiótico líquido N° 39.^{26, 27}

Debido a que se evidenció que el proceso de medición de la respuesta inhibitoria por el método turbidimétrico se dificulta al determinar un apropiado tiempo de incubación; ya que la óptima lectura del ensayo depende de la subjetividad del analista, en el momento de establecer el término del ensayo según la turbidez del crecimiento (ver tabla N° 7); el método microbiológico por difusión en agar nos da como ventaja controlar de manera más adecuada este factor de variabilidad y las respuestas obtenidas frente a distintas dosis del antibiótico Tilosina tartrato las cuales fueron proporcionales a los diámetros de los halos de inhibición.

El método turbidimétrico presentó dificultades en su ejecución. A pesar que se utilizó la dosis de Tilosina tartrato mencionada en la USP, el método no fue sensible en la concentración referida.^{26, 27}

Además para la ejecución del método se debe tomar especial precaución en asegurar la uniformidad de temperatura en el Baño María, por los motivos expuestos en las limitaciones del método turbidimétrico (ver punto 3.4.2.1). Y como caso excepcional, la USP establece para el término de la incubación en la valoración de la potencia de la Tilosina, el incremento de la temperatura del Baño maría de 80 °C a 90 °C por 2 a 6 minutos; lo cual no detuvo el crecimiento de los microorganismos y se obtuvo variabilidad en la opacidad de los tubos.

Sin embargo, se desarrolló el método de difusión en agar por excavación para la valoración de potencia antibiótica de Tilosina tartrato, el cual fue sensible a una dosis media de 10 ug, y se pudo obtener resultados precisos dentro de las especificaciones establecidas por la farmacopea.²⁷

Como parte del proceso de selección del microorganismo en la evaluación del método de difusión en agar por excavación se realizaron diferentes pruebas:

Se compararon los microorganismos *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29737; siendo los resultados insatisfactorios; debido a las características propias de estos microorganismos, la actividad propia del antibiótico Tilosina tartrato, concentraciones del inóculo, tiempo de difusión en el agar y de incubación.

Para el caso de la cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, se observó que los halos de inhibición eran de forma irregular y superpuestos con comportamiento variable.

La cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 formó halos de inhibición no delineados y pequeños en diámetro (Ver tabla N° 5)

La USP 30 recomienda el uso de *Micrococcus luteus* ATCC 9341, posteriormente reclasificado a *Kocuria rhizophila*.²³ (Ver Anexo 6), para la valoración de Eritromicina mediante el método de difusión en agar.²⁶ (Ver Anexo N° 5). Teniendo en consideración que la Tilosina es un macrólido al igual que Eritromicina se evaluó este microorganismo para el método propuesto.

Este microorganismo es mencionado en la bibliografía consultada como microorganismo de preferencia para la determinación de potencia antibiótica para la Tilosina.^{4,5}

Otros microorganismos podrían ser usados, sólo si ellos muestran ser sensibles al antibiótico valorado. El microorganismo seleccionado, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341²⁴, debe ser cultivado en un medio apropiado y en condiciones de temperatura y pH adecuados.

Con este microorganismo se obtuvo una respuesta óptima de inhibición, con halos mejor definidos y con longitudes de diámetro repetitivos según la

concentración del antibiótico y de comportamiento constante. Definido el microorganismo, se cultivó en las condiciones según la USP.²⁶

Para determinar la concentración del inóculo se utilizó la escala Mac Farland N°1, pero estas expresaban halos de inhibición deformes o no había presencia de halos en las placas Petri, que contenían la menor concentración de estándar; sin embargo, con la escala N° 2 de Mac Farland se obtuvo como resultados una demarcación satisfactoria de las zonas de inhibición, produciendo una relación lineal entre el logaritmo de la dosis y la respuesta en las condiciones del ensayo.

En las preparaciones de la solución madre del estándar y muestras problemas, se siguió las indicaciones de la farmacopea de referencia²⁶

Se realizaron diversos ensayos de potencia antibiótica de Tilosina Tartrato con diferentes sistemas de concentración de dosis, hasta obtener resultados confiables y reproducibles. Seleccionando la dosis media de 10µg.

Antes de proceder con la incubación de las placas Petri inoculadas fue necesario que el antibiótico difunda adecuadamente en el agar; caso contrario se produce un crecimiento de los microorganismos en paralelo con la escasa difusión del antibiótico, teniendo como consecuencia una actividad inhibitoria no satisfactoria.²¹

En la farmacopea no precisa el tiempo de difusión para la valoración de la Tilosina tartrato en Agar Antibiótico N° 11.^{5, 6} La amplitud de la difusión del antibiótico será afectada por la composición, profundidad del agar y del tiempo, debido a que la difusión ocurre en tres dimensiones.¹⁶

La farmacopea de referencia menciona un periodo de difusión de 1 a 4 horas a una temperatura de 4°C, la cual minimiza los efectos de la variación en el tiempo de aplicación de la solución y mejorar la curva.⁶

Se dejó difundir en un periodo de 4 horas, observando halos de inhibición, para la dosis media, de longitud promedio de 5 mm, estos valores no son aceptables. Cuando se utilizó un rango de tiempo de 8 horas a 4°C las diluciones de Tilosina tartrato, con un volumen de dosis 20µl/ excavación, se obtuvieron datos aceptables.

El tiempo y temperatura de incubación se realizó según farmacopea de referencia.²⁶

Según los resultados obtenidos se obtuvo la gráfica de la recta, el cual nos permitió establecer que los resultados son directamente proporcionales a la concentración de la dosis. Ver tabla N° 6

En la bibliografía consultada se encontró una metodología semejante a la propuesta en: el microorganismo utilizado, inoculación y acondicionamiento del microorganismo en las placas.⁴ Pero difiere en las concentraciones de las dosis (St1 a ST5) del estándar, la preparación del estándar, solventes utilizados.

Por lo que no se encontró un trabajo similar de acuerdo a los parámetros óptimos planteados en la presente investigación.

Las condiciones óptimas de trabajo expuestas en la presente tesis son resultados referenciales para una posterior estandarización y validación de la metodología de análisis.

VII. CONCLUSIONES

1. Con los resultados obtenidos se puede concluir que el método microbiológico de difusión por excavación en agar permite estimar la potencia antibiótica de la tilosina tartrato de manera confiable y precisa. Hallándose los límites inferior y superior de confianza, de los tres lotes analizado, dentro del rango de 95% al 105% referido por la BP2008.
2. Las potencias antimicrobianas de la Tilosina tartrato de los tres lotes analizados A, B, C fueron de: 1006.2252 μ /mg (104.8058 %), 913.1573 (99.5809%); 961.2549 (104.826%); cumpliendo con la especificación establecida en la USP 30 (no menor de 800 μ g por mg).
3. El microorganismo *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 es sensible al antibiótico Tilosina tartrato en el medio antibiótico N° 11 en las condiciones propuestas.
4. Se determinaron experimentalmente las condiciones óptimas del método microbiológico de difusión en agar por excavación de la potencia antimicrobiana de Tilosina tartrato, siendo estas: Dosis media: 10 μ g/mL, tiempo de difusión del antibiótico de 8 h; microorganismo utilizado *Kocuria rhizophila* ATCC9341, concentración del inóculo equivalente a escala Mac Farland N° 2, temperatura de incubación 32 a 35 °C, tiempo de incubación 24 horas.
5. La metodología de análisis empleada es lineal, por cuanto nos permitió obtener resultados proporcionales en comparación con los resultados de las dosis de la muestras y de los estándares USP utilizados. Se hallaron los coeficientes de determinación (r^2) cuyos resultados fueron de 0,99; 0,98 y 0,98 siendo aceptables los ensayos realizados.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Utilizar microorganismos ATCC para eliminar variables biológicas externas que pueden interferir con los ensayos.
2. Tratar en lo posible de utilizar estándar USP, para el caso del estándar de tilosina tartrato, tener precaución en las condiciones de conservación a temperatura de 4°C.
3. Realizar diferentes pruebas en la dosis media del estándar, y ajustar la dosis hasta obtener los resultados satisfactorios.
4. Antes de incorporar la segunda capa de agar inoculado, tener todas las placas listas; ya que la operación debe realizarse rápidamente para evitar grumos debido al enfriamiento del agar. El agar inoculado no debe estar a una temperatura mayor de los 40 °C.
5. Al incorporar el antibiótico en la placa inoculada, dejar difundir el antibiótico en diferentes periodos de tiempo (en esta fase de desarrollo del ensayo, el volumen de dosis adicionada por excavación en el agar, cumple un papel relevante); ya que existe una relación directamente proporcional entre el volumen y el tiempo de difusión, la cual influye en las dimensiones de los halos de inhibición.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTIBIÓTICOS COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO EN ANIMALES. Febrero 2002. Publicación del Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja- Logroño (Disponible en : <http://www.scielo.isciii.es/pdf/gv/v16n2/edit02.pdf>. Consultado el 20 de Abril del 2008)
2. ANTIBIOTICS TYLOSIN AND DESCOMYCOSIN AND DERIVATIVES. Robert L. Hamili Michael E, Haner Jr. United States Patent Office Nº 3178341 (Disponible en: <http://www.freepatentsonline.com/3178341.html>. Consultado el 29 del Enero del 2007)
3. ALVARADO ALVA, JUAN C. 1999 Apuntes médicos del Perú. antibióticos y quimioterápicos. 2^{da} Edición Lima Perú.
4. BIOASSAY FOR THE DETECTION, IDENTIFICATION AND QUANTITATION OF ANTIMICROBIAL RESIDUES IN MEAT AND POULTRY TISSUE. (Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_34_02.pdf. Consultado el 20 de Abril del 2008)
5. BRITISH PHARMACOPOEIA 2004 London- UK
6. BRITISH PHARMACOPOEIA 2008 London- UK
7. CAMACHO ANDREA, ARIAS PALACIOS; Implementación y estandarización de la técnica para la determinación de potencia microbiológica de Neomicina en crema tópica fabricada en una planta productora de medicamentos Departamento de Microbiología Congreso de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, 2003, Trujillo, Lima - Peru.

8. CAPROVE Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios
(Disponible en: <http://www.caprove.com.ar>. Consultado el 31 de Agosto del 2008)
9. CARME PRATS, FUXET. Comportament Farmacocinètic i Depleció Tisular de la Tilosina en Vedees i Porcs. Tesis Doctoral del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Universidad Autónoma de Barcelona. (Disponible en: http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/browse/by_author/all.html Consultado el 20 de Abril del 2008)
10. COMUNIDAD ANDINA Normativa Andina - Decisión 483 Normas para el registro, control, comercialización y uso de Productos Veterinarios (Disponible en: <http://www.comunidadandina.org/normativa/dec/D483.html>. Consultado el 31 de Agosto del 2008)
11. DIARIO OFICIAL EL PERUANO. Publicado el 23 de Febrero del 2002 D.S. 016- 2002- AG Aprueba el Texto Único de Procedimientos Administrativos del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (Disponible en: <http://www.el-peruano.com.pe>. Consultado el 31 de Agosto del 2008)
12. FOCUSVET; Revista de Marketing Veterinario. Grandes Animales Mercado de Grandes Animales. (Disponible en: <http://www.focusvet.com.ar/index.php?archivo=nota.php&idseccion=2&idnota=37>. Consultado el 25 de Abril del 2008)
13. GESTIÓN VETERINARIA ADMINISTRACIÓN VETERINARIA O MANAGEMENT VETERINARIO. (Disponible en: http://www.vet-uy.com/articulos/artic_ges/013/013bas.htm. Consultado el 25 de Abril del 2008)

14. HANDBOOK OF MEDICINES USED IN VETERINARY PRACTICE, 1993
The Veterinary Formulary 2^{da} Edición London
15. KONEMAN E. ALLEN S. DOWELL V. 1992, Diagnostic Microbiology.
Editorial Panamericana. Buenos Aires- Argentina
16. LITTER M. ,1998 Farmacología Experimental y Clínica. Séptima Edición
Editorial el Ateneo. Buenos Aires - Argentina
17. MERCK KGaA Microbiology Manual 2000. Laboratory Products Division.
18. MOTIVAR La apuesta fuerte al mercado veterinario. Artículo publicado
en la revista on line El valor de estar informados.
(Disponible en: <http://www.periodicomotivar.com.ar>. Consultado el 25 de
Abril del 2008)
19. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1996 Buenas prácticas de
Manufactura Vigentes. Serie de Informes Técnicos de la OMS (823).
Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las
Preparaciones Farmacéuticas. Informe 32. Ginebra.
20. PELCZAR M, REID R, CHAN E. 1990 Microbiología. Segunda Edición
Editorial Mac graw-Hill Madrid
21. PROCEDIMIENTOS DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA recomendaciones
de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología
Clínica (Disponible en <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia>.
Consultado el 20 de Enero del 2007)
22. SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA (SENASA). Publicado el
22 de Julio de 1998 Decreto Supremo N° 015-98-AG Aprueba el

Reglamento de Registro, Control y Comercialización de Productos de Uso Veterinario y Alimentos para Animales. (Disponible en: <http://www.senasa.gob.pe>. Consultado el 31 de Agosto del 2008)

23. SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA (SENASA). Publicado el 05 de Marzo de 1998. Resolución Jefatural N° 031-98-AG Requisitos Sanitarios para Registro y Autorización de Empresas Fabricantes, Distribuidoras y Expendedoras de Productos de Uso Veterinario.. (Disponible en: <http://www.senasa.gob.pe>. Consultado el 31 de Agosto del 2008)

24. RECLASSIFICATION OF ATCC 9341 FROM *MICROCOCCUS LUTEUS* TO *KOCURIA RHIZOPHILA*. - International Journal System Evolution Microbiology 53 (2003). (Disponible en: <http://www.ij.sgmjournals.org> Consultado el 20 de Abril del 2008)

25. THE INDEX MERCK Encyclopedia of chemical, drugs and biologicals Merck & Co., Inc Whitehouse Station, NJ 13th Edition 2001 USA

26. THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA USP 30 – 2007 The National Formulary 25 USA.

27. THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA USP 31. - 2008 The National Formulary 26 USA